

Jurandir Joaquim Bernardes Júnior

**Produção e qualidade do sêmen da piava *Megaleporinus obtusidens*:
efeito do hormônio liberador de gonadotropina e da solução
ativadora**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Orientador: Alex Pires de Oliveira Nuñez
Coorientador: Robie Allan Bombardelli

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bernardes Júnior, Jurandir Joaquim

Produção e qualidade do sêmen da piava
Megaleporinus obtusidens: efeito do hormônio
liberador de gonadotropina e da solução ativadora /
Jurandir Joaquim Bernardes Júnior ; orientador,
Alex Pires de Oliveira Nuñez, coorientador, Robie
Allan Bombardelli, 2017.

101 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. reprodução artificial. 3.
osmolalidade. 4. motilidade espermática. 5. CASA.
I. Nuñez, Alex Pires de Oliveira . II. Bombardelli,
Robie Allan . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.
IV. Título.

**Produção e qualidade do sêmen da piava *Megaleporinus obtusidens*:
efeito do hormônio liberador de gonadotropina e da solução
ativadora**


Por

JURANDIR JOAQUIM BERNARDES JÚNIOR

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.



Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr
Coordenador do Programa
de PG em Aquicultura
Portaria 1938/GR/2012

Banca Examinadora:

Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez – *Orientador*




Dr. Evoy Zaniboni Filho - UFSC



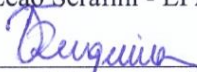
Dr. Hilton Amaral Junior - EPAGRI



Dr. José Luiz Pedreira Mourinho - UFSC



Dr. Raphael De Leao Serafini - EPAGRI



Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira - UFSC

Dedico este trabalho a minha família
que sem ela de nada valeria tanto
esforço. Ao meus pais, razão da minha
existência. À minha esposa Débora pelo
amor e apoio imprescindível em todos
os momentos e ao meu enteado Vitor
pela paciência em minhas frequentes
ausências.

AGRADECIMENTOS

À Débora Ortiz Lugli Bernardes, minha amada esposa pela presença indispensável em todos os momentos da minha trajetória, incentivando e apoiando com toda paciência e carinho.

Ao Prof. Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñer que proporcionou todo o necessário para realização deste Doutorado, tranquilizando-me diante das dificuldades e sobretudo pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli pela parceria, contribuindo com suas ideias, visão crítica e pela viabilização das análises de osmolalidade.

Ao amigo Jhon Edison Jimenez Rojas cuja ajuda foi fundamental na execução do árduo trabalho que cerca os quatro anos de um Doutorado.

Ao amigo Giovano Neumann pela capacitação na ferramenta CASA e na análise da osmolalidade, que a todo momento esteve disposto a auxiliar e tirar as dúvidas.

A equipe Lapadiana meu sincero MUITO OBRIGADO: Luciano, Maurício, Renata, Claudia, Giuliano, Ronaldo, Fernando, Josiane, Gicella, Samara, Bruno, Ana Paula, Gianfrancisco, Jaqueline, Carolina Lopes, Carolina Hoppe, Fernanda, Jade, Vitor, Fabíola, Patrick, Pedro, Stella, Carlos, Natalia, Eliziane, Vanessa.

A EPAGRI pela parceria e apoio na logística de campo, especialmente ao Hilton, Silvano e Leandro.

A CAPES pela concessão de uma bolsa de estudos vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da UFSC.

Ao Carlito pela presteza frente à Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

“Raciocínio sem aspereza.
Sentimento sem preguiça.
Caridade sem pretensão.
Conhecimento sem vaidade.
Cooperação sem exigência.
Devotamento sem apelo.
Dignidade sem orgulho.
Firmeza sem petulância.
Respeito sem bajulice.”
(Neiva Chaves Zelaya)

RESUMO

A piava *Megaleporinus obtusidens* faz parte de um grupo seletivo de espécies nativas da América do Sul utilizadas na aquicultura cujo conhecimento sobre o cultivo ainda é muito fragmentado. Os aspectos básicos de sua reprodução são conhecidos, no entanto o sucesso na propagação artificial nem sempre é alcançado. Considerando os diversos fatores que influenciam a reprodução de peixes migradores em cativeiro, a presente tese avaliou a produção e a qualidade do sêmen de animais induzidos com um análogo do hormônio liberador das gonadotropinas (gonadorelina) e o efeito da osmolalidade e da composição da solução ativadora sobre a motilidade espermática. No primeiro estudo, o sêmen de peixes induzidos com dose única de gonadorelina (20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peixe) foi avaliado quanto ao volume produzido, à concentração espermática, à presença de anormalidades morfológicas, à integridade de membrana e aos parâmetros de motilidade, em comparação ao protocolo comumente utilizado na reprodução desta espécie que utiliza o extrato pituitário de carpa (EPC; 4,0 mg kg^{-1} de peixe). Com os resultados obtidos foi possível substituir o EPC por gonadorelina na indução à espermição de *Megaleporinus obtusidens* utilizando uma dose mínima efetiva de 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sem que tenham sido observadas alterações no volume e na qualidade do sêmen. No segundo estudo, o movimento espermático foi avaliado em diferentes osmolalidades (25, 85, 145, 205, 265 e 325 mOsm kg^{-1}) e soluções ativadoras (frutose, NaCl e KCl). A osmolalidade foi o principal gatilho para o início do movimento espermático de *Megaleporinus obtusidens* e em osmolalidade intermediária (145 mOsm kg^{-1}), independentemente da composição da solução, a duração da motilidade foi prolongada (>50 s) e a taxa de motilidade se manteve em patamares elevados (60–70 %) na maior parte do tempo pós-ativação. As variações ao longo do tempo pós-ativação na velocidade curvilínea e na linearidade foram semelhantes entre NaCl e frutose enquanto o KCl se destacou por alterar o comportamento dos espermatozoides, produzindo velocidade curvilínea superior, baixa velocidade retilínea e uma trajetória de deslocamento predominantemente circular.

Palavras-chave: Aquicultura, reprodução artificial, osmolalidade, motilidade espermática, CASA.

ABSTRACT

Megaleporinus obtusidens belongs to a select group of South American native species used in aquaculture whose knowledge about cultivation is still very fragmented. Basic aspects of its reproduction are known, however success in artificial propagation is not always guaranteed. Regarding the different factors that influence the reproduction of Brazilian migratory fish in captivity, the current study evaluated the production and quality of semen of gonadorelin-treated fish, and the effect of osmolality and composition of the activating solution on sperm motility. In the first experiment, in order to identify a suitable substitute to the protocol commonly used in the reproduction of this species, that uses carp pituitary (CPE; 4.0 mg kg⁻¹ BW), the effect of gonadorelin (20, 40, 60, 80 and 100 µg kg⁻¹ BW) on the total volume of expressible semen, sperm concentration, membrane integrity, presence of morphological abnormalities, and sperm motility of *M. obtusidens* was investigated. The results showed that a single-dose of gonadorelin of 60 µg kg⁻¹ was effective in increasing the volume of semen produced by *M. obtusidens*, indicating that it may be used as a substitute for CPE, since it has a similar effect on semen quality. In the second experiment, sperm motility of *M. obtusidens* was evaluated in different osmolality (25, 85, 145, 205, 265, and 325 mOsm kg⁻¹) and activating solutions (fructose, NaCl, and KCl). Sperm motility was triggered by decreasing osmolality. At intermediate osmolality (145 mOsm kg⁻¹) all activating solutions extended the duration of motility (>50 s), and maintained the motility rate at levels of 60–70% most of the time. Variations over the post-activation time between NaCl and fructose were similar for curvilinear velocity and linearity, while KCl was notable for altering spermatozoa swimming pattern, producing high curvilinear velocity, low straight-line velocity, and a predominantly circular swimming path.

Keywords: Aquaculture, artificial reproduction, osmolality, sperm motility, CASA.

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Efeito da osmolalidade sobre a taxa de motilidade (média \pm DP, $n = 6$) dos espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens* ativados com frutose, NaCl ou KCl aos 10 (linha contínua), 30 (linha segmentada) e 50 s (linha pontilhada) pós-ativação..... 65
- Fig. 2. Efeito da frutose, NaCl e KCl sobre a taxa de motilidade (média \pm DP, $n = 6$) dos espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens* avaliados ao longo do tempo pós-ativação nas osmolalidades 25, 85, 145, 205, 265 e 325 mOsm kg⁻¹. Letras diferentes em cada tempo pós-ativação indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre soluções..... 67
- Fig. 3. Efeito da frutose, NaCl e KCl sobre a velocidade curvilinear (VCL; média \pm DP, $n = 6$) dos espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens* avaliados ao longo do tempo pós-ativação nas osmolalidades 25, 85, 145, 205 e 265 mOsm kg⁻¹. Letras diferentes em cada tempo pós-ativação indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre soluções..... 69
- Fig. 4. Efeito da frutose, NaCl e KCl sobre a velocidade linear (VSL; média \pm DP, $n = 6$) dos espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens* avaliados ao longo do tempo pós-ativação nas osmolalidades 25, 85, 145, 205 e 265 mOsm kg⁻¹. Letras diferentes em cada tempo pós-ativação indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre soluções..... 70
- Fig. 5. Efeito da frutose, NaCl e KCl sobre a linearidade do movimento (média \pm DP, $n = 6$) espermático de *Megaleporinus obtusidens* avaliada ao longo do tempo pós-ativação nas osmolalidades 25, 85, 145, 205 e 265 mOsm kg⁻¹. Letras diferentes em cada tempo pós-ativação indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre soluções..... 71
- Fig. 6. Trajetória de espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens* ativados com NaCl ou frutose apresentando linearidade $\geq 0,8$ (A) ou entre 0,4 e 0,8 (B). O item (C) representa a trajetória de espermatozoides ativados com KCl, com linearidade $\leq 0,4$ 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração iônica e osmolalidade do líquido seminal em teleósteos de água doce, conforme a literatura.	29
Tabela 2. Produção e qualidade do sêmen de <i>Megaleporinus obtusidens</i> ($n = 6$) não induzidos (Controle negativo; C-) ou induzidos com EPC (Controle positivo; C+; 4mg kg^{-1}) ou gonadorelina (GnRH; $\mu\text{g kg}^{-1}$).	46
Tabela 3. Características da motilidade do sêmen de <i>Megaleporinus obtusidens</i> ($n = 6$) não induzido (Controle negativo; C-) ou induzido com EPC (Controle positivo; C+; 4 mg kg^{-1}) ou gonadorelina (GnRH, $\mu\text{g kg}^{-1}$), aos 10 e 50 s pós-ativação.....	47
Tabela 4. Rendimento e custo por quilo de peixe da gonadorelina e de extrato pituitário de carpa (EPC) para indução hormonal de machos de <i>Megaleporinus obtusidens</i>	48
Tabela 5. Características do sêmen e do líquido seminal de <i>Megaleporinus obtusidens</i> ($n = 6$).....	63
Tabela 6. Parâmetros das regressões ajustadas para a taxa de motilidade do sêmen de <i>Megaleporinus obtusidens</i> ($n = 36$).....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina 3',5'- monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CASA	Análise espermática assistida por computador
CEDAP	Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
EPC	Extrato pituitário de carpa
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador das gonadotropinas
GnRH _a	Análogo do hormônio liberador das gonadotropinas
LAPAD	Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce
LH	Hormônio luteinizante
LHRH	Hormônio liberador do hormônio luteinizante
LHRH _a	Análogo do hormônio liberador do hormônio luteinizante
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VAP	Velocidade ao longo de uma trajetória média
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade em linha reta

SUMÁRIO

1	Introdução Geral.....	23
1.1	Cenário atual do cultivo de espécies nativas.....	23
1.2	Particularidades da reprodução de peixes migradores	24
1.3	A Piava.....	24
1.4	Indução Hormonal.....	26
1.5	Motilidade espermática	28
2	Justificativa	33
3	Objetivos	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2	Objetivos Específicos.....	35
4	Artigos elaborados	37
4.1	Artigo 1 – A gonadorelina aumenta a produção de sêmen sem alterar sua qualidade em <i>Megaleporinus obtusidens</i>	39
4.1.1	Resumo	39
4.1.2	Introdução	40
4.1.3	Material e Métodos	41
4.1.3.1	Manejo dos reprodutores.....	41
4.1.3.2	Indução hormonal.....	42
4.1.3.3	Coleta e avaliação do sêmen	42
4.1.3.4	Relação custo-benefício dos hormônios.....	43
4.1.3.5	Análises estatísticas	44
4.1.4	Resultados.....	44
4.1.5	Discussão	48
4.1.6	Conclusões.....	51
4.1.7	Referências	51
4.2	Artigo 2 - A osmolalidade e a composição da solução ativadora afetam a motilidade do sêmen de <i>Megaleporinus obtusidens</i>	57
4.2.1	Resumo	57
4.2.2	Introdução	58
4.2.3	Material e Métodos	60
4.2.3.1	Os peixes e a coleta do sêmen	60
4.2.3.2	Soluções ativadoras	60
4.2.3.3	Avaliação da motilidade espermática.....	61
4.2.3.4	Caracterização do sêmen e do líquido seminal.....	61
4.2.3.5	Análises estatísticas	62
4.2.4	Resultados.....	63

4.2.4.1	Características do sêmen e do líquido seminal	63
4.2.4.2	Motilidade espermática	64
4.2.5	Discussão	73
4.2.6	Conclusões	78
4.2.7	Referências	78
5	Conclusões gerais	85
6	Considerações finais	87
7	Referências bibliográficas da introdução	89
APÊNDICE A – PARÂMETROS UTILIZADOS NO PLUGIN CASA .		100
ANEXO A – PROTOCOLO CEUA		101

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CENÁRIO ATUAL DO CULTIVO DE ESPÉCIES NATIVAS

A participação das espécies nativas de peixes na produção aquícola nacional se encontra muito aquém do seu potencial. O desenvolvimento da cadeia produtiva, ainda precária, e a existência de pacotes tecnológicos para a produção de espécies exóticas justificam a centralização da produção nestas espécies. Como exemplo tem-se a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) que em 2015 contribuiu com 45,4% (220 mil toneladas) do total de peixes cultivados no país (IBGE, 2015).

Por outro lado, esforços no campo científico (desenvolvimento de pesquisas) e econômico (estruturação da cadeia produtiva) realizados com o objetivo de aumentar o número de espécies cultivadas, sobretudo privilegiando as espécies nativas brasileiras, fizeram com que o tambaqui ocupasse a segunda colocação na produção nacional com 135.857.980 t (28,1%) (IBGE, 2015).

Em 2015, a região Sul do Brasil apresentou um crescimento de 13% na produção geral de pescado cultivado e Santa Catarina foi o estado com a quarta maior produção nacional de peixes (33.744.141 t) provenientes da aquicultura de água doce (IBGE, 2015). A atenção direcionada para o jundiá (*Rhamdia quelen*) através das redes de pesquisas entre instituições (EPAGRI, UFSC, UFSM, UFPR, UPF, USP e Instituto de Pesca), a transferência de conhecimento para o setor produtivo e as parcerias público-privadas possibilitaram que importantes etapas forem cumpridas para o desenvolvimento de um pacote tecnológico para esta espécie, cuja produção em 2013 atingiu 762 toneladas em Santa Catarina (SILVEIRA; SILVA; CASACA, 2014).

No entanto, várias espécies reofílicas com importante valor de mercado como o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), o cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*), o curimatã (*Prochilodus lineatus*), o dourado (*Salminus brasiliensis*), a matrinxã (*Brycon amazonicus*), a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), a piapara (*Megaleporinus elongatus*) e a piava (*Megaleporinus obtusidens*), ainda são pouco expressivas em termos de produção. Em 2015, estas espécies somaram aproximadamente 39 mil toneladas, cerca de 8,0 % do total nacional (IBGE, 2015).

A estruturação da cadeia produtiva, com seus múltiplos componentes econômicos, técnicos e políticos, é um processo complexo.

Do ponto de vista técnico, o conhecimento sobre a reprodução, larvicultura, engorda, nutrição e sanidade para a maioria das espécies está fragmentado, sendo que para algumas espécies migradoras a reprodução ainda é um entrave importante para a expansão do seu cultivo comercial.

1.2 PARTICULARIDADES DA REPRODUÇÃO DE PEIXES MIGRADORES

A reprodução dos peixes migradores brasileiros está restrita a um curto período do ano, que normalmente compreende alguns meses da primavera e verão (AGOSTINHO et al., 2003; ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003). Embora os padrões migratórios se diferenciem entre espécies e bacias hidrográficas, a migração (piracema) propriamente dita, a maturação final e a liberação dos gametas são estimuladas por variações na temperatura, pluviosidade e condutividade elétrica (ZANIBONI-FILHO; NUÑER, 2004), que garantem condições adequadas para a sobrevivência e crescimento da prole (MUNRO, 1990; CARRILLO; ZANUY; BAYARRI, 2009).

Nas condições lênticas de cativeiro, estes peixes deixam de receber certos estímulos externos e a resposta endócrina necessária para a maturação gonadal final é atenuada. Assim, o desenvolvimento ovocitário é interrompido ao final da vitelogênese (ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007). Nos machos, no entanto, a espermatogênese normalmente é completada, e os espermatozoides flagelados são liberados nos dutos seminais, que após a hidratação dos testículos estão prontos para a liberação (ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007). Disfunções reprodutivas em machos como a redução do volume de sêmen produzido e a incapacidade de espermição são relatadas para peixes de cativeiro (GOMES; URBINATI, 2010; MARIA et al., 2012).

1.3 A PIAVA

A piava *Megaleporinus obtusidens* é uma espécie reofílica que ocorre nas Bacias do Paraná-Paraguai e Uruguai (AGOSTINHO et al., 2003; ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003) e atinge a primeira maturação (L_{50}) com 25,0 cm (AGOSTINHO et al., 2003). Assim como a maior parte dos peixes migradores, apresenta desova total (ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003).

No baixo rio Paraná se reproduz entre outubro e dezembro (TELICHEVSKY DE FOLGUERA, 1981) e entre novembro e janeiro

no alto rio Paraná (Brasil) (AGOSTINHO et al., 2003). No baixo rio Uruguai (Argentina) a reprodução ocorre durante a primavera (setembro a dezembro), com migrações longitudinais (ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003). No reservatório Yacyretá (Argentina e Paraguai) a época de desova corresponde ao período entre os meses de agosto e dezembro (ARAYA; AGOSTINHO; BECHARA, 2005). No alto rio Uruguai, a piava pode ser encontrada no reservatório de Itá e dentro das imediações do Parque Estadual do Turvo (SCHÜTZ; NUÑER; ZANIBONI-FILHO, 2008; ZANIBONI-FILHO et al., 2008) e embora não haja informações sobre o período reprodutivo na região, Reynalte-Tataje et al. (2008) encontraram larvas na foz do rio Chapecó durante os meses de novembro e dezembro, na confluência com Rio Uruguai.

Na década de 1980 foram realizados os primeiros trabalhos relacionados ao cultivo da piava em cativeiro, nos quais foram analisados o ciclo sexual e a maturação gonadal (TELICHEVSKY DE FOLGUERA, 1981) e, a adaptação e o crescimento com dietas artificiais (PARMA, 1980; PARMA DE CROUX, 1984). A partir da década seguinte uma série de estudos foi publicada abordando aspectos mais específicos, como a taxa metabólica (PARMA DE CROUX, 1993), a organização histológica dos testículos (GONZO et al., 1995), a idade e o crescimento (ARAYA, 1999), a alimentação em cativeiro com diferentes fontes proteicas (FELIPETTO et al., 2005; RADÜNZ NETO et al., 2006; LAZZARI et al., 2007), a suplementação alimentar com vitaminas (DE MELLO et al., 1999), os regimes alimentares (DIAS JÚNIOR; MOURGUÉS-SCHURTER, 2001), a parasitologia (FELTRAN et al., 2004; BARASSA, 2009), a variação hormonal pós-alimentação (DIAS JÚNIOR; MOURGUÉS-SCHURTER, 2009), a influência da temperatura sobre a maturação gonadal em sistema *indoor* (BERNARDES JÚNIOR, 2012) e a utilização da espécie como bioindicadora em estudos ecotoxicológicos (GLUSCZAK et al., 2006; GIODA et al., 2007; MORAES et al., 2007; DA FONSECA et al., 2008; MIRON et al., 2008; COSTA; HARTZ, 2009; MORAES et al., 2009; SALBEGO et al., 2010).

Em cativeiro, a piava completa o processo de maturação testicular (espermatogênese e espermição), entretanto, a qualidade e a quantidade do sêmen produzido frequentemente são insatisfatórias, e nem sempre garantem o sucesso nos procedimentos de fertilização induzida (REYNALTE-TATAJE et al., 2002; STREIT JR et al., 2008). Os machos produzem sêmen branco e viscoso, com concentração que varia entre $1,19 \pm 0,39 \times 10^{10}$ (TAITSON; CHAMI; GODINHO, 2008) e $1,66 \pm 0,75 \times 10^{10}$ espermatozoides mL⁻¹ (BERNARDES JÚNIOR, 2012).

A produção de sêmen concentrado e com volume reduzido é característica típica do gênero *Megaleporinus* (REYNALTE-TATAJE et al., 2002; RIBEIRO; GODINHO, 2003; VIVEIROS; GODINHO, 2009), sendo que nos procedimentos de reprodução artificial, os machos normalmente são submetidos à indução hormonal com intuito de aumentar o volume coletado de sêmen (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983; ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007).

1.4 INDUÇÃO HORMONAL

A reprodução induzida por hormônios exógenos tem sido amplamente utilizada para diversas espécies ao longo dos últimos 80 anos, uma vez que proporciona um controle direto sobre os estágios finais do ciclo reprodutivo dos peixes (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983).

Os primeiros estudos envolvendo espécies nativas brasileiras datam da década de 1930 (IHERING, 1937), e desde então diversos registros atestam reproduções bem-sucedidas utilizando diferentes hormônios, como o extrato pituitário de carpa (EPC), os hormônios liberadores das gonadotropinas de salmão (GnRH), de mamíferos (LHRH) e seus análogos (GnRHa e LHRHa) (HARVEY; CAROLSFELD, 1993; ZANIBONI-FILHO; NUÑER, 2004).

O EPC é o indutor mais utilizado na reprodução artificial de peixes migradores brasileiros, sendo aplicado como complemento às gonadotropinas endógenas que deixaram de ser processadas devido à ausência de estímulos ambientais adequados (ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007). Resultados positivos foram obtidos na reprodução de *Megaleporinus macrocephalus* (REYNALTE-TATAJE et al., 2002), *M. elongatus* (SATO et al., 2000; STREIT JR et al., 2008), *M. obtusidens* (MURGAS et al., 1999), *Leporinus piau* (SAMPAIO; SATO, 2009) e *L. friderici* (ORFÃO et al., 2011).

Um protocolo muito utilizado para machos do gênero *Megaleporinus* é a aplicação de duas doses de EPC (0,4 e 4,0 mg kg⁻¹ de peixe) com intervalo de 10 a 12 horas entre aplicações (ZANIBONI-FILHO; BARBOSA, 1996; REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO, 2010). Entretanto, variações no número de aplicações e na dosagem estão descritas na literatura. Dose única (2,5–3,0 mg kg⁻¹ de peixe) foi utilizada para *M. elongatus* (SATO et al., 2000; STREIT JR et al., 2008) e *M. macrocephalus* (STREIT JR et al., 2003). Para *M. obtusidens*, Murgas et al. (1999) adotaram um protocolo com três aplicações (0,25, 0,4, e 4,0 mg kg⁻¹ de peixe). Doses muito baixas, no

entanto, podem ser ineficientes, como foi demonstrado por Reynalte-Tataje et al. (2002), os quais não obtiveram aumento da produção de sêmen de *M. macrocephalus* utilizando dose única de 0,4 mg EPC kg⁻¹ de peixe.

A incidência de anormalidades morfológicas em espermatozoides de peixes induzidos com hipófises de diferentes animais é outro fator a ser considerado. Em estudos conduzidos com *M. elongatus*, o volume de sêmen produzido foi menor e o percentual de espermatozoides anormais foi significativamente maior em peixes tratados com hipófise de coelho do que nos tratados com hipófises de frango e carpa (STREIT JR et al., 2003; MORAES et al., 2004).

Independentemente da espécie, a técnica de hipofização é efetiva e pode ser facilmente empregada em fazendas de cultivo. Sua maior desvantagem é a dificuldade de padronização da potência pois a concentração dos hormônios gonadotróficos pode variar entre hipófises de mesmo peso (MAÑANÓS; DUNCAN; MYLONAS, 2008).

Por outro lado, os hormônios liberadores das gonadotropinas (GnRH/LHRH) e seus análogos (GnRHa/LHRHa) apresentam vantagens importantes no processo de indução reprodutiva pois atuam no início da cadeia hormonal, estimulando principalmente a liberação das gonadotropinas endógenas (LH e FSH). Por serem estruturas simples, são facilmente fabricadas, apresentam grande estabilidade estrutural e são efetivas em pequenas dosagens (HARVEY; CAROLSFELD, 1993; ZANUY et al., 2009).

A única publicação disponível até o presente sobre a reprodução induzida utilizando análogos de hormônios liberadores das gonadotropinas em espécies do gênero *Megaleporinus* existe para *M. macrocephalus* (RIBEIRO; GODINHO, 2003). No estudo, peixes com 450 g receberam dose única (2,1 µg kg⁻¹) de buserelina e produziram, em média, 0,4 mL de sêmen. No entanto, os análogos se mostraram eficazes na indução de outras espécies migratórias como *Colossoma macropomum* (gonadorelina) (MUNIZ; CATANHO; SANTOS, 2008), *Brycon amazonicus* (D-ALA6) (PARDO-CARRASCO et al., 2006), *B. orbignyanus* (buserelina) (PAULINO et al., 2011), *Piaractus mesopotamicus* (D-ALA6 e buserelina) (PAULINO et al., 2011; ZANIBONI-FILHO, 1995; ZANIBONI-FILHO; BARBOSA, 1996) e *Prochilodus lineatus* (D-ALA6 e buserelina) (PAULINO et al., 2011; ZANIBONI-FILHO; BARBOSA, 1996).

1.5 MOTILIDADE ESPERMÁTICA

A habilidade do espermatozoide em fertilizar com sucesso os ovócitos depende primeiramente da qualidade dos gametas, que é resultado do estado nutricional, da idade dos reprodutores e das condições ambientais de cultivo, tais como temperatura da água, fotoperíodo, concentração de oxigênio dissolvido e densidade de estocagem (BOBE; LABBÉ, 2010; FAUVEL; SUQUET; COSSON, 2010).

Em peixes teleósteos os espermatozoides permanecem imóveis nos testículos e dutos (BILLARD et al., 1995; BOBE; LABBÉ, 2010). No líquido seminal esta condição é mantida devido a presença de íons (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) que conferem elevada osmolalidade, enquanto os constituintes orgânicos (e.g. carboidratos, lipídeos, enzimas, proteínas) nutrem e atuam no metabolismo energético dos espermatozoides (VERMA et al., 2009; CIERESZKO; GLOGOWSKI; DABROWSKI, 2011). A concentração dos compostos iônicos e a osmolalidade do líquido seminal variam entre espécies (Tabela 1), e para uma mesma espécie são observadas diferenças ao longo do período reprodutivo (CIERESZKO; GLOGOWSKI; DABROWSKI, 2011).

Tabela 1. Concentração iônica e osmolalidade do líquido seminal em teleosteos de água doce, conforme a literatura.

Família	Espécie	Na ⁺ (mM L ⁻¹)	K ⁺ (mM L ⁻¹)	Ca ²⁺ (mM L ⁻¹)	Mg ²⁺ (mM L ⁻¹)	Cl ⁻ (mM L ⁻¹)	Osmolalidade (mOsm kg ⁻¹)	Referência
Cyprinidae	<i>Cyprinus carpio</i>	78,0 ± 5,0	63,0 ± 6,0	43,5 ± 4,5				KRASZNAI et al., 2003
	<i>Barbus barbus</i>	75,7 ± 1,8	84,7 ± 2,8	0,4 ± 0,0			346,0 ± 18,3	KRUGER et al., 1984
	<i>Tinca tinca</i>	18,4	1,93	0,6		125,3 ± 1,2	268,0 ± 4,0	ALAVI et al., 2008
	<i>Vimba vimba</i>						230,0 ± 82,0	LINHART et al., 2003
	<i>Carla calla</i>	106,0 ± 1,2	25,0 ± 1,2				318 ± 18,8	ALAVI et al., 2010
	<i>Labes rohita</i>	85,2 ± 1,0	32,1 ± 1,1			246,0 ± 2,0	278,0 ± 7,0	VERMA et al., 2009
	<i>Labes calbasu</i>	94,0 ± 2,3	51,0 ± 3,7			175,0 ± 4,3	269,0 ± 5,5	VERMA et al., 2009
	<i>Cirrhinus mrigala</i>	81,8 ± 3,6	48,6 ± 2,4			245,0 ± 7,7	289,0 ± 8,0	VERMA et al., 2009
	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	64,0 ± 1,2	25,0 ± 0,8			174,0 ± 5,2	284,0 ± 7,5	VERMA et al., 2009
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	110,0 ± 0,8	36,0 ± 1,2			226,0 ± 0,8	276,0 ± 4,3	VERMA et al., 2009
Bryconidae	<i>Brycon orthogynaxius</i>	67,2 ± 11,4	37,2 ± 2,9	4,2 ± 1,2	1,1 ± 0,1	253,0 ± 0,4	269,0 ± 1,8	VERMA et al., 2009
	<i>Brycon hilarii</i>						303,1 ± 13,7	MOJICA, 2004
	<i>Brycon insignis</i>						301,0 ± 11,0	GONCALVES et al., 2013
	<i>Brycon opalinus</i>	74,2 ± 5,6	28,4 ± 4,3	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,1		369,4 ± 28,9	MOJICA, 2004
Prochilodontidae	<i>Prochilodus lineatus</i>						286	SHIMODA et al., 2007
							318,0 ± 3,0	ORFÃO et al., 2011
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	110,0 ± 7,3	43,4 ± 2,0	2,1 ± 0,4	2,5 ± 0,3		337,0 ± 8,0	GONCALVES et al., 2013
	<i>Salmo trutta</i>	121,0 ± 0,4	8,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1	3,2 ± 0,1	129,0 ± 7,3	308,0 ± 12,9	VIVEIROS et al., 2016
Pimelodidae	<i>Pseudoplatystoma metaense</i>	145,7 ± 3,9	6,4 ± 0,3			125,6 ± 0,4		KOLDRAS et al., 1996
	<i>Rhamdia quelen</i>	125,6 ± 2,7	7,2 ± 0,8	1,0 ± 0,1	2,4 ± 0,4			BOZKURT et al., 2011
	<i>Oreochromis mossambicus</i>	153,7 ± 2,4	10,7 ± 0,5	4,2 ± 0,2	0,9 ± 0,1			
Cichlidae							336,6 ± 3,9	LINHART et al., 1999

A motilidade é ativada quando o sêmen entra em contato com a água (BOBE; LABBÉ, 2010) e na maioria das espécies, permanece em movimento por menos de dois minutos (KIME et al., 2001; RURANGWA et al., 2004). Fatores como a temperatura, a osmolalidade, a concentração iônica e o pH da solução ativadora influenciam a motilidade dos espermatozoides (ALAVI; COSSON, 2005; 2006).

A pressão osmótica (osmolalidade) é o principal fator controlador da motilidade dos espermatozoides de ciprinídeos (COSSON, 2004; ALAVI; COSSON, 2006) e de Characíformes, como *Colossoma macropomum* (CARNEIRO et al., 2012), *Brycon insignis* (SHIMODA et al., 2007), *B. orbigniaui* e *Prochilodus lineatus* (GONÇALVES et al., 2013).

Para diferentes espécies, choques hiposmóticos inferiores a 100, 180, 200, 225, 270 e 274 mOsm kg⁻¹ são suficientes para ativar os espermatozoides de *Brycon opalinus* (ORFÃO et al., 2011), *B. orbignyanus* (GONÇALVES et al., 2013), *Cyprinus carpio* (ALAVI; COSSON, 2006), *Prochilodus lineatus* (GONÇALVES et al., 2013; VIVEIROS et al., 2016), *Colossoma macropomum* (CARNEIRO et al., 2012) e *Brycon insignis* (SHIMODA et al., 2007), respectivamente.

No entanto, variações extremas na pressão osmótica podem causar alterações na morfologia e na capacidade de movimentação dos espermatozoides, a exemplo do que ocorre com *Cyprinus carpio* quando os espermatozoides são ativados com água destilada (~ 0 mOsm kg⁻¹) (PERCHEC et al., 1996) ou contaminados com urina (POUPARD et al., 1998).

Além da osmolalidade, a composição é um quesito a ser considerado na escolha da solução ativadora pois pode influenciar a duração da motilidade (COSSON, 2004). A solução mais comumente utilizada na avaliação da qualidade do sêmen é a água (destilada, deionizada, de poço ou da rede pública) que normalmente apresenta osmolalidade próxima de zero. Formulações constituídas por um único sal (e.g. NaCl, KCl, NaHCO₃, CaCl₂) ou carboidrato (e.g. glicose, sacarose, manitol), ou soluções compostas pela combinação destes solutos, adicionados a pequenas concentrações de outros sais (e.g. MgSO₄, Na₂HPO₄, KH₂PO₄), são empregadas com o objetivo de aumentar a taxa de motilidade e prolongar o tempo de ativação. Para *Megaleporinus obtusidens*, embora a água seja o ativador normalmente utilizado na avaliação da motilidade (MURGAS et al., 1999; MURGAS et al., 2002), soluções de NaCl (50 mM ~ 100 mOsm kg⁻¹) e NaHCO₃ (119 mM ~ 238 mOsm kg⁻¹) produziram as maiores taxas de motilidade

em sêmen fresco e crioconservado, respectivamente (TAITSON; CHAMI; GODINHO, 2008).

Vários estudos avaliaram o efeito dos íons nos mecanismos que controlam a motilidade do espermatozoide (COSSON, 2004; ALAVI; COSSON, 2006; MORISAWA, 2008), no entanto, para alguns íons é difícil distinguir seu papel (DZYUBA; COSSON, 2014). A participação do Ca^{2+} e K^{+} na ativação é melhor compreendida em ciprinídeos e salmonídeos.

Em ciprinídeos, a diferença de pressão osmótica entre o líquido seminal e o meio circundante no momento em que o sêmen é liberado na água promove a abertura dos canais de K^{+} . Devido à menor concentração extracelular deste íon, ocorre um efluxo de K^{+} e em resposta, a membrana é hiperpolarizada (KRASZNAI et al., 2000). A hiperpolarização ativa os canais de Ca^{2+} permitindo o influxo deste íon (KRASZNAI et al., 2000; INABA, 2003). Em soluções livres de Ca^{2+} a motilidade não é ativada (MORISAWA, 2008). O aumento intracelular de Ca^{2+} , além de ativar outros canais e moléculas sinalizadoras, modula a assimetria do batimento flagelar que direciona a trajetória do movimento (INABA, 2003; KRASZNAI et al., 2003).

Em salmonídeos a presença de K^{+} no líquido seminal exerce a função de bloqueador da motilidade. Este efeito é comprovado quando baixas concentrações (na ordem de mM) de K^{+} na solução ativadora são capazes de inibir a ativação (KHO et al., 2001; DZIEWULSKA; DOMAGAŁA, 2013). Quando o sêmen é diluído em solução ativadora, a redução gradual do potencial elétrico da membrana plasmática (hiperpolarização) ocorre concomitantemente com a redução gradual na concentração extracelular de K^{+} , estimulando a síntese de AMP cíclico, que por sua vez desencadeia os demais eventos que iniciam a motilidade espermática (KHO; MASAOKI; CHOI, 2003; MORISAWA, 2008).

Portanto, o sucesso na propagação de espécies migratórias, como a piava, depende da seleção de reprodutores maduros, de um método eficiente para a reprodução artificial, da produção de gametas de qualidade e da utilização de um protocolo de fertilização que leve em consideração as características bioquímicas e cinéticas do sêmen.

2 JUSTIFICATIVA

Um dos primeiros desafios para o sucesso da produção de juvenis de espécies nativas migradoras é o domínio das técnicas de propagação artificial. Após o êxito obtido na indução de peixes migradores brasileiros utilizando extrato pituitário de carpa (EPC) na década de 1930, estudos para identificação de outros indutores ficaram restritos a poucas espécies. Na prática, o EPC ainda hoje é o indutor mais utilizado para espécies de água doce. A efetividade do EPC é indiscutível e talvez este tenha sido o motivo pelo qual para muitas espécies apenas se replicou o protocolo anteriormente desenvolvido.

Além da eficácia, questões como custo e disponibilidade para compra são fundamentais na escolha dos hormônios. A hipófise de carpa, base do EPC, apresenta custo elevado (1,0 g = R\$ 1.700,00; valor de mercado em outubro de 2016) e os processos legais para sua importação dificultam a aquisição, uma vez que não é produzida comercialmente no Brasil. Há ainda um reduzido número de fornecedores no país, tornando o acesso ao produto ainda mais restritivo. Por outro lado, atualmente estão disponíveis no comércio nacional, produtos veterinários contendo hormônio liberador de gonadotropina (e.g. gonadorelina, buserelina) que apresentam menor custo e podem ser adquiridos em um amplo número de lojas especializadas.

Considerando-se o baixo volume de sêmen produzido pela piava e a consequente necessidade de indução hormonal, encontrar uma alternativa eficiente e economicamente viável ao EPC torna-se um avanço necessário para a propagação desta espécie.

Na reprodução em cativeiro, ainda que sejam fornecidas as condições adequadas (densidade de estocagem, alimentação, qualidade de água) para a manutenção dos reprodutores e a maturação gonadal, inúmeros fatores externos influenciam a qualidade final do sêmen e a capacidade de fertilização. Quando o sêmen é liberado na água durante a reprodução natural ou é diluído em solução ativadora durante a fertilização artificial, a motilidade dos espermatozoides é influenciada por variáveis como a temperatura, o pH, a pressão osmótica e a composição e concentração iônica do meio circundante. A influência é exercida não somente sobre a taxa de ativação, mas pode alterar a velocidade e trajetória do deslocamento, favorecendo ou não o encontro entre os espermatozoides e os ovócitos.

Estudos que abordam os efeitos dos inúmeros fatores externos na motilidade espermática são necessários para a elaboração de soluções

ativadoras. A padronização de uma solução ativadora, por sua vez, é importante para a determinação da viabilidade do sêmen e de um protocolo de fertilização artificial. Muitas vezes as soluções são utilizadas com o intuito de prolongar o tempo de motilidade durante a fertilização artificial pois para algumas espécies parece que o aumento da duração da motilidade espermática tem uma forte correlação positiva com a capacidade de fertilização.

O conhecimento sobre a motilidade espermática da piava é restrito às taxas de ativação em água, obtidas através de avaliação subjetiva. A composição seminal e as características cinéticas do movimento espermático como a velocidade e linearidade do deslocamento também são desconhecidas. Portanto, avaliar a resposta dos espermatozoides da piava à diferentes pressões osmóticas e soluções ativadoras possibilita compreender a atuação de fatores ambientais no comportamento espermático e, futuramente, permitirá aumentar a eficiência da fertilização artificial e das técnicas de criopreservação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Aprimorar as técnicas de indução hormonal e ativação da motilidade dos espermatozoides da piava *Megaleporinus obtusidens*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de gonadorelina sobre a produção e a qualidade do sêmen fresco de *Megaleporinus obtusidens* como um substituto ao extrato pituitário de carpa;
- Avaliar o efeito da osmolalidade e da composição da solução ativadora sobre a motilidade do sêmen fresco de *Megaleporinus obtusidens*.

4 ARTIGOS ELABORADOS

Esta tese é composta por dois artigos

1. A gonadorelina aumenta a produção de sêmen sem alterar sua qualidade em *Megaleporinus obtusidens*

Elaborado de acordo com as normas da revista *Animal Reproduction Science* (Qualis B1, Fator de impacto: 1.377, SJR: 0,711).

<https://www.elsevier.com/journals/animal-reproduction-science/0378-4320/guide-for-authors>

2. A osmolalidade e a composição da solução ativadora afetam a motilidade do sêmen de *Megaleporinus obtusidens*

Elaborado de acordo com as normas da revista *Theriogenology* (Qualis B1, Fator de impacto: 1.838, SJR: 0,842).

<https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>

4.1 ARTIGO 1 – A GONADORELINA AUMENTA A PRODUÇÃO DE SÊMEN SEM ALTERAR SUA QUALIDADE EM *MEGALEPORINUS OBTUSIDENS*

4.1.1 RESUMO

A utilização do extrato pituitário de carpa (EPC) como um indutor hormonal para *Megaleporinus obtusidens* é economicamente dispendioso além de conter concentração incerta de gonadotropinas. A eficácia da gonadorelina (GnRH), como um substituto ao EPC, sobre o volume total, a concentração espermática, a integridade de membrana, a presença de anormalidades morfológicas, a motilidade espermática e a relação custo-benefício do sêmen da piava *Megaleporinus obtusidens* ($622,8 \pm 161,8$ g) foi avaliada nas doses 20, 40, 60, 80 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peixe ($n = 6$ cada tratamento). Peixes não induzidos ou tratados com EPC ($4,0 \text{ mg kg}^{-1}$) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente ($n = 6$ cada controle). Os hormônios foram aplicados em dose única por via intramuscular e após 200 horas-grau o sêmen foi coletado. Com doses superiores a $60 \mu\text{g kg}^{-1}$, todos os peixes responderam à indução e produziram volume superior ($P < 0,05$) ao do controle negativo ($0,2\text{--}0,8 \text{ mL kg}^{-1}$) e igual ($P > 0,05$) ao controle positivo ($3,52 \pm 0,97 \text{ mL kg}^{-1}$). A concentração espermática não foi influenciada ($P > 0,05$) pelo tratamento hormonal. O percentual de espermatozoides morfolologicamente normais foi superior a 64 % em todos os tratamentos. A taxa de espermatozoides com membrana íntegra variou entre 70 e 85 % e foi igual ($P > 0,05$) ao registrado nos controles. Os peixes tratados com gonadorelina apresentaram taxa de motilidade igual ($P > 0,05$) ao controle negativo e na dose de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ foi inferior ($P < 0,05$) ao controle positivo, 10 s pós-ativação. A velocidade curvilínea foi igual ($P > 0,05$) a observada em ambos os controles. A trajetória dos espermatozoides foi aleatória ($0,4\text{--}0,8$) ao 10 s após a ativação e predominantemente linear ($\geq 0,8$) aos 50 s. Considerando a taxa de resposta dos peixes induzidos com gonadorelina e a semelhança da qualidade do sêmen com relação aos controles, a dose mínima efetiva de gonadorelina para produzir um maior volume de sêmen em *Megaleporinus obtusidens* é de $60 \mu\text{g kg}^{-1}$. Nesta dose o custo para induzir um quilo de *M. obtusidens* (US\$ 1,84) é 14 % inferior ao do EPC (US\$ 2,14).

Palavras chave: Espécie migradora, reprodução artificial, volume de sêmen, CASA, GnRH.

4.1.2 INTRODUÇÃO

O uso de hormônios no controle do ciclo reprodutivo de peixes reofílicos é fundamental para a propagação artificial de espécies de interesse comercial, como as do gênero *Megaleporinus* (Zaniboni-Filho and Nuñez, 2004; Zaniboni-Filho and Weingartner, 2007; Reynalte-Tataje and Zaniboni-Filho, 2010), para o qual destacam-se *Megaleporinus obtusidens*, *M. elongatus*, e *M. macrocephalus*.

Em cativeiro, estas espécies completam o processo de maturação testicular (espermatogênese e espermiacão), porém frequentemente a qualidade e a quantidade do sêmen produzido não são satisfatórias, de modo que nem sempre garantem sucesso na reprodução artificial (Reynalte-Tataje et al., 2002; Streit Jr et al., 2008). Como agravante, os machos do gênero *Megaleporinus* geralmente produzem baixa quantidade de sêmen, o que faz com que o volume seja uma variável crítica para a reprodução induzida (Arguello et al., 2001; Ribeiro and Godinho, 2003; Streit Jr et al., 2008; Gutiérrez, 2011).

O extrato pituitário de carpa (EPC) é o indutor hormonal mais utilizado em peixes migradores brasileiros para aumentar o volume de sêmen, e atua suprimindo o déficit de gonadotropinas que não foram processadas devido ao cativeiro (Zaniboni-Filho and Weingartner, 2007; Orfão, 2013). Em machos do gênero *Megaleporinus* os protocolos de indução com EPC variam, sendo comumente empregadas dose única (2,5–3,0 mg kg⁻¹) (Sato et al., 2000; Streit Jr et al., 2003), duas doses (0,3–0,4 e 3,0–4,0 mg kg⁻¹) (Murgas et al., 2002; Reynalte-Tataje and Zaniboni-Filho, 2010) ou três doses (0,25, 0,4 e 4,0 mg kg⁻¹) (Murgas et al., 1999). Apesar de eficiente, a concentração de gonadotropinas pode variar entre hipófises de mesmo peso, dificultando a padronização da potência (Harvey and Carolsfeld, 1993; Mañanós et al., 2008). Outra desvantagem é a necessidade de sacrificar o doador para obtenção da hipófise.

O hormônio liberador das gonadotropinas (GnRH) e seus análogos são utilizados com menos frequência no Brasil, mas provaram ser eficientes na ovulação e na desova de espécies nativas (Zaniboni-Filho and Barbosa, 1996; Muniz et al., 2008; Chaves-Moreno et al., 2011; Paulino et al., 2011; Felizardo et al., 2012; Andrade et al., 2014; Alarcón et al., 2015). O efeito destes hormônios na produção e na qualidade do sêmen de peixes reofílicos foi avaliado em *Prochilodus lineatus* utilizando gonadorelina (Andrade et al., 2014) e buserelina (Paulino et al., 2011), em *Colossoma macropomum* induzido com

gonadorelina (Muniz et al., 2008) e em *Brycon orbignyanus* utilizando buserelina (Paulino et al., 2011).

O hormônio liberador das gonadotropinas e seus análogos apresentam vantagens importantes no processo de indução reprodutiva, pois atuam no início da cadeia hormonal estimulando a liberação das gonadotropinas endógenas (LH e FSH). Por serem estruturas simples, são facilmente fabricados, apresentam alta estabilidade estrutural, são efetivos em pequenas dosagens e não produzem reação alérgica ou resistência após tratamentos sucessivos (Harvey and Carolsfeld, 1993; Rainis and Ballestrazzi, 2005; Zanuy et al., 2009).

A reprodução de *Megaleporinus obtusidens* está restrita a primavera e ao verão (novembro a fevereiro) e uma vez ao ano os piscicultores selecionam os machos que liberam sêmen sob leve pressão no abdômen para os procedimentos de reprodução artificial. Com o objetivo de encontrar um substituto eficaz e economicamente viável para o EPC, o efeito da gonadorelina sobre a espermiacção de *Megaleporinus obtusidens* maduros foi investigado, avaliando-se o volume total de sêmen coletado, a concentração espermática, a integridade de membrana, a presença de anormalidades morfológicas e a motilidade dos espermatozoides.

4.1.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.3.1 MANEJO DOS REPRODUTORES

Neste estudo, foram utilizados *Megaleporinus obtusidens* com seis anos de idade, obtidos pela reprodução induzida de reprodutores selvagens capturados no rio Uruguai. Durante o período reprodutivo (dezembro/2015), peixes ($n = 42$; $622,8 \pm 161,8$ g) que liberaram sêmen sob leve pressão abdominal (Woynarovich and Horváth, 1983) foram selecionados em um viveiro de terra (200 m²) no Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú (EPAGRI-CEDAP; 27°0'49.22" S; 48°39'49.41" W), transportados para o Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD-UFSC; 27°43'44.57" S; 48°30'32.64" W) e distribuídos aleatoriamente em seis tanques circulares de fibra de vidro com fundo cônico (800 litros de água, > 6,0 mg O₂ L⁻¹, 24–25 °C).

4.1.3.2 INDUÇÃO HORMONAL

Para avaliar o efeito da gonadorelina (sob a forma de acetato tetrahidrato; GnRH sintético de mamífero; Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂; Profertil, Fabiani Saúde Animal Ltda, São Paulo, SP, Brasil) sobre a produção e a qualidade do sêmen foram testadas as dosagens 20, 40, 60, 80 e 100 µg kg⁻¹ de peixe ($n = 6$ por tratamento), definidas após pré-teste. No pré-teste, a gonadorelina (5, 25 e 45 µg kg⁻¹), o hormônio luteinizante purificado de suínos (50, 100 e 150 µg kg⁻¹; Lutropin V) e o extrato pituitário de carpa (2, 4 e 6 mg kg⁻¹) foram avaliados quanto a capacidade de aumentar a produção de sêmen, dentre os quais apenas a gonadorelina (25 e 45 µg kg⁻¹) e o extrato pituitário de carpa (4 e 6 mg kg⁻¹) produziram volume de sêmen superior ao de peixes não induzidos.

O extrato pituitário de carpa (EPC, Danubio Aquacultura, Blumenau, SC, Brasil) na dose 4 mg kg⁻¹ de peixe ($n = 6$) foi utilizado como protocolo padrão (controle positivo). Os hormônios foram diluídos em solução salina (0,9 %; 1,0 mL kg⁻¹) e aplicados em única injeção intramuscular. Um grupo de peixes ($n = 6$) não recebeu hormônio nem solução salina (controle negativo).

4.1.3.3 COLETA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN

Duzentas horas-grau (24,5 °C) após a indução hormonal o sêmen foi coletado por pressão abdominal com auxílio de seringas graduadas (3,0 mL), e avaliado quanto ao volume relativo (mL kg⁻¹ de peixe), à concentração espermática, à presença de anormalidades morfológicas, à motilidade, e à integridade de membrana. Após a coleta, as amostras foram transferidas para tubos tipo eppendorf (2,0 mL) e mantidas em caixa de isopor com placas de gel térmico (9–13 °C) até o final das análises.

Uma alíquota de 10 µL de sêmen fresco foi diluída (1:1000, sêmen:volume total) em solução de formol-citrato (2,9 g de citrato de sódio e 1,0 mL de formaldeído 40 % em 100 mL água deionizada) para análise da concentração espermática, determinada através da contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer (CBRA, 1998), e presença de anormalidades morfológicas.

Para a análise morfológica, 5,0 µL de corante rosa bengala (3 %) foi adicionado a 100 µL de sêmen fixado e uma extensão foi realizada (Streit Jr et al., 2004). Depois de seca, a lâmina foi observada em microscópio de luz (×1000, Leica DMLB, Bannockburn, IL, USA) para

contagem ($n = 200$) e classificação dos espermatozoides em normais ou com anormalidades primárias ou secundárias. As anormalidades morfológicas primárias foram cauda quebrada, enrolada, curta, degenerada e corrugada, e as secundárias foram cauda dobrada e cabeça e cauda soltas (Streit Jr et al., 2008).

A motilidade foi avaliada imediatamente após a coleta do sêmen, por meio da análise computacional assistida (CASA). O sêmen foi ativado por diluição (1:1000; sêmen:volume final) em solução de bicarbonato de sódio (119mM, 24 °C, pH 8,5), sendo que 10 μ L da mistura foram pipetados em câmara de Neubauer, cobertos com lamínula e posicionados em microscópio de luz ($\times 10$).

O movimento dos espermatozoides foi gravado durante 1 s aos 10 e 50 s pós-ativação, utilizando uma câmara CMOS (Basler A602fc, Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Alemanha) a uma taxa de captura de 100 quadros por segundo. A compilação e a análise dos vídeos produzidos foram realizadas com o *plugin* CASA (Wilson-Leedy and Ingermann, 2007) para o software ImageJ (Rasband, 1997-2016), tendo sido utilizado o protocolo proposto por Kime et al. (2001) e Wilson-Leedy and Ingermann (2007). As variáveis avaliadas foram a taxa de motilidade, a velocidade curvilínea, a velocidade ao longo de um deslocamento médio, a velocidade em linha reta e a linearidade. Os valores iniciais de configuração do *plugin* encontram-se no apêndice A.

A integridade de membrana foi avaliada pelo método de coloração eosina-nigrosina (Blom, 1950). Uma alíquota de 10 μ L de sêmen fresco foi diluída em 100 μ L de solução inativadora (NaCl 200 mM). Em seguida 10 μ L desta diluição foram adicionados a 40 μ L de eosina b (3%) e 50 μ L de nigrosina (5%). Uma lâmina de extensão foi preparada e 200 espermatozoides foram contados em microscópio de luz ($\times 400$). Foram consideradas íntegras as células que não coraram (Kavamoto and Fogli da Silveira, 1986).

Todos os procedimentos e manejos experimentais dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (Protocolo CEUA nº PP00788; Anexo A).

4.1.3.4 RELAÇÃO CUSTO-BENEFÍCIO DOS HORMÔNIOS

A relação custo-benefício de cada hormônio foi calculada a partir do seu rendimento e do custo para induzir um quilo de peixe, tendo como base o valor médio dos produtos comercializados por fornecedores no Brasil. Os valores foram apresentados em dólar

americano, cotado em três reais e dezoito centavos (R\$ 3,18) na média do mês de outubro de 2016.

4.1.3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A relação entre a dose hormonal e cada variável de qualidade do sêmen foi inicialmente avaliada através da análise de regressão, utilizando modelos lineares e não lineares (Zar, 2010). Na ausência de relação, os tratamentos foram comparados com os controles através do teste de Dunnett (Zar, 2010). A transformação angular foi aplicada a taxa de motilidade e aos dados de morfologia, e a logarítmica ($\log [x+1]$) às demais variáveis.

Os três descritores de velocidade (média, curvilinear e linear) foram submetidos à análise de correlação linear de Pearson. Devido à forte correlação positiva ($r > 0,85$ para todas as correlações; $P < 0,01$; $n = 42$) e por apresentarem o mesmo padrão entre os tratamentos, a velocidade curvilinear foi selecionada para representar as demais velocidades.

4.1.4 RESULTADOS

A análise de regressão evidenciou ausência de relação ($P > 0,05$) linear e não linear entre as doses de gonadorelina e todas as variáveis espermáticas quantificadas.

O volume de sêmen coletado em peixes do controle negativo variou entre 0,2 e 0,8 mL kg⁻¹. Alguns peixes induzidos com gonadorelina nas doses 20 ($n = 1$) e 40 ($n = 2$) µg kg⁻¹ não responderam ao hormônio, uma vez que o volume produzido foi igual ou inferior ao máximo obtido no controle negativo e, portanto, foram excluídos da análise do volume. A partir da dose 60 µg kg⁻¹, 100 % dos peixes responderam à indução com gonadorelina e produziram volume superior ($P < 0,05$) ao controle negativo (peixes não induzidos), e igual ($P > 0,05$) ao controle positivo (EPC) (Tabela 2).

A taxa de espermatozoides com membrana íntegra variou entre 69 e 84 % e nenhuma diferença foi observada em relação aos controles ($P > 0,05$) (Tabela 2). O percentual de espermatozoides morfologicamente normais se manteve acima de 64 % e nenhum efeito ($P > 0,05$) da gonadorelina no aparecimento de anormalidades foi observado em relação ao controle negativo (Tabela 2). No entanto, comparado com o controle positivo, o percentual de espermatozoides normais em peixes induzidos com 20 µg kg⁻¹ foi menor ($P < 0,05$) e,

consequentemente, o aparecimento de anormalidades secundárias foi maior ($P < 0,05$).

A concentração espermática não foi influenciada ($P > 0,05$) pelo tratamento hormonal (Tabela 2). O número total de espermatozoides coletados em peixes tratados com gonadorelina nas doses de 20, 60 e 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foi maior ($P < 0,05$) que no controle negativo e nenhuma diferença foi observada entre as diferentes doses de gonadorelina e o controle positivo (Tabela 2).

A gonadorelina não afetou a taxa de motilidade, exceto aos 10 s pós-ativação, quando os peixes induzidos com 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ apresentaram percentual menor ($P < 0,05$) ao produzidos pelo controle positivo (Tabela 3).

A velocidade curvilinear nos peixes tratados com gonadorelina foi semelhante ($P > 0,05$) a observada para os peixes dos controles negativo e positivo em ambos os tempos pós-ativação (Tabela 3). A trajetória dos espermatozoides foi aleatória (0,4–0,6) aos 10 s pós-ativação, independentemente do tratamento, e nos peixes induzidos com 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de gonadorelina, a linearidade foi menor ($P < 0,05$) que a registrada para o EPC (Tabela 3). Aos 50s pós-ativação, o deslocamento tendeu para uma trajetória linear (0,9) e não foi influenciada ($P > 0,05$) pelo tratamento hormonal.

Os custos para induzir um quilo de peixe utilizando EPC ou gonadorelina estão apresentados na Tabela 4. Na dose de 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ o custo é 14% menor que o obtido com EPC.

Tabela 2. Produção e qualidade do sêmen de *Megaleporinus obtusidens* ($n = 6$) não induzidos (Controle negativo; C-) ou induzidos com EPC (Controle positivo; C+; 4mg kg⁻¹) ou gonadorelina (GnRH; µg kg⁻¹).

Grupo	Volume (mL kg ⁻¹)	Membrana íntegra (%)	Espermatozoides Normais (%)	Anormalidades morfológicas (%)		Concentração (×10 ¹⁰ spz. mL ⁻¹)	Total de espermatozoides (×10 ¹⁰)
				Primárias	Secundárias		
C-	0,55 ± 0,33	74,95 ± 14,74	68,39 ± 12,81	25,07 ± 7,85	6,54 ± 2,89	3,58 ± 1,31	0,80 ± 0,44
EPC (C+)	3,52 ± 0,97	72,08 ± 13,76	79,38 ± 7,02	16,76 ± 6,32	3,86 ± 1,79	2,47 ± 0,59	4,33 ± 1,52
GnRH 20 ^a	3,42 ± 1,41*	69,19 ± 10,14	64,12 ± 8,45 [#]	23,38 ± 8,66	12,50 ± 4,93 [#]	2,24 ± 0,88	4,66 ± 2,83*
GnRH 40 ^b	2,58 ± 1,05*	73,37 ± 6,64	74,26 ± 7,66	19,19 ± 5,7	6,55 ± 3,02	1,70 ± 0,51	2,55 ± 1,30
GnRH 60	4,68 ± 2,96*	84,14 ± 3,65	81,42 ± 11,68	13,22 ± 7,91	5,36 ± 3,28	2,56 ± 0,88	8,09 ± 3,87*
GnRH 80	3,99 ± 2,14*	75,38 ± 7,76	83,77 ± 6,99	12,23 ± 6,25	4,00 ± 2,29	2,35 ± 0,94	6,18 ± 2,13*
GnRH 100	2,88 ± 1,65*	79,14 ± 13,24	76,24 ± 7,67	19,59 ± 9,25	4,17 ± 2,36	1,83 ± 0,55	3,23 ± 1,21

^a $n = 5$ para o volume; ^b $n = 4$ para o volume.

*Diferença significativa ($P < 0,05$; Dunnett) em relação ao controle negativo (C-).

[#] Diferença significativa ($P < 0,05$; Dunnett) em relação ao EPC (C+).

Tabela 3. Características da motilidade do sêmen de *Megaleporinus obtusidens* ($n = 6$) não induzido (Controle negativo; C-) ou induzido com EPC (Controle positivo; C+; 4 mg kg⁻¹) ou gonadorelina (GnRH, µg kg⁻¹), aos 10 e 50 s pós-ativação.

Grupo	Motilidade (%)		Velocidade curvilinear (µm s ⁻¹)		Linearidade	
	10 s	50 s	10 s	50 s	10 s	50 s
C-	64,32 ± 9,14	33,53 ± 5,18	167,70 ± 13,62	79,43 ± 4,13	0,44 ± 0,09	0,92 ± 0,02
EPC (C+)	68,21 ± 6,92	51,61 ± 13,88	162,68 ± 13,51	81,40 ± 5,23	0,60 ± 0,06	0,93 ± 0,02
GnRH 20	44,70 ± 9,23 [#]	32,42 ± 10,80	149,78 ± 11,38	83,04 ± 3,19	0,59 ± 0,13	0,92 ± 0,02
GnRH 40	68,94 ± 15,38	55,87 ± 10,96	162,27 ± 17,47	85,21 ± 4,72	0,53 ± 0,08	0,92 ± 0,01
GnRH 60	62,25 ± 14,80	46,49 ± 12,15	157,74 ± 4,68	84,82 ± 5,03	0,52 ± 0,07 [#]	0,88 ± 0,06
GnRH 80	58,14 ± 14,17	48,44 ± 14,30	161,94 ± 17,67	84,62 ± 8,53	0,59 ± 0,08	0,91 ± 0,02
GnRH 100	56,26 ± 14,78	47,39 ± 12,75	155,96 ± 11,22	87,42 ± 7,08	0,54 ± 0,07	0,92 ± 0,02

[#] Diferença significativa ($P < 0,05$; Dunnett) em relação ao EPC (C+).

Tabela 4. Rendimento e custo por quilo de peixe da gonadorelina e de extrato pituitário de carpa (EPC) para indução hormonal de machos de *Megaleporinus obtusidens*.

Hormônio	Embalagem	Custo unitário (US\$)*	Dose	Custo por kg de peixe (US\$)*
Gonadorelina	500 µg	15,35	20 µg kg ⁻¹	0,61
			40 µg kg ⁻¹	1,23
			60 µg kg ⁻¹	1,84
			80 µg kg ⁻¹	2,46
			100 µg kg ⁻¹	3,07
EPC	1000 mg	534,59	4 mg kg ⁻¹	2,14

* Cotação média do dólar em outubro/2016: US\$ 1,00 = R\$ 3,18.

4.1.5 DISCUSSÃO

O principal efeito esperado pela indução de machos das espécies do gênero *Megaleporinus* é o aumento do volume de sêmen produzido, o que foi obtido com o uso da gonadorelina para *Megaleporinus obtusidens*, uma vez que esse hormônio foi efetivo e induziu a produção de volume igual ao de peixes induzidos com o EPC.

Embora o local de atuação direta no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas do EPC (testículos) e da gonadorelina (hipófise) sejam distintos, a elevação temporária dos níveis de gonadotropinas, principalmente LH (Mylonas et al., 1997; Viveiros et al., 2002), e a hidratação dos dutos testiculares, resultante do incremento na produção de líquido seminal pelas células de Sertoli e vesículas seminais (Mylonas et al., 2017), são descritos como os principais efeitos de ambos os indutores quando uma única dose é utilizada. Portanto, o aumento no volume de sêmen em *Megaleporinus obtusidens* induzidos com gonadorelina parece ser resultado do estímulo na produção de líquido seminal.

Alguns estudos demonstraram que um rápido incremento do volume de sêmen normalmente foi sucedido por uma redução na concentração espermática (Maria et al., 2011; Mylonas et al., 1997; Viveiros et al., 2002). Esta redução, entretanto, não foi constatada para *Megaleporinus obtusidens*. Os peixes induzidos com gonadorelina produziram um volume de sêmen de 4 a 8 vezes maior que o produzido pelos peixes não induzidos, sem alterar a concentração espermática.

Resultado semelhante foi observado para *Clarias gariepinus* cuja concentração se manteve inalterada enquanto o volume de sêmen produzido aumentou em 4 vezes após a indução com EPC (8 e 10 mg kg⁻¹) (Viveiros et al., 2002). Nessa magnitude, o incremento na produção de líquido seminal aparentemente não foi suficiente para reduzir a concentração de espermatozoides.

Por outro lado, a concentração espermática reduziu significativamente em espécies cujo aumento no volume de sêmen após a indução hormonal foi na ordem de 10 vezes ou mais. Em *Colossoma macropomum* induzidos com EPC (0,25 e 2,5 mg kg⁻¹) o volume de sêmen coletado foi 25 vezes maior que em peixes não induzidos e, em resposta à elevada hidratação dos testículos, a concentração de espermatozoides reduziu em aproximadamente 50% (Maria et al. 2011). Para o *Brycon amazonicus* um aumento de 10 vezes no volume após indução com EPC (0,4 e 4,0 mg kg⁻¹) resultou numa redução de 55% na concentração espermática (Pardo-Carrasco et al., 2006).

O número total de espermatozoides liberados também aumentou em *Megaleporinus obtusidens* induzidos com gonadorelina em comparação aos peixes não induzidos. Como a espermatogênese é um processo que dura dias (Nobrega et al., 2009; Schulz et al. 2010), é pouco provável que no período entre a aplicação da dose e coleta do sêmen (~8 h) a produção de células espermáticas tenha aumentado, conforme ocorre nos protocolos com injeções sucessivas ou implantes de liberação lenta (Mylonas and Zohar, 2000). Esse resultado sugere que o aumento da pressão hidrostática dentro dos testículos devido ao incremento no volume de líquido seminal promoveu o carreamento de maior quantidade de espermatozoides presentes nos dutos espermáticos, o que não seria acessível em peixes não induzidos durante os procedimentos de extração manual (Mylonas et al. 2017; Rainis and Ballestrazzi, 2005; Viveiros et al., 2002).

Aparentemente *Megaleporinus obtusidens* é o congênere que apresenta menor restrição quanto ao volume produzido após o tratamento hormonal. Em *M. elongatus* e *M. muyscorum* induzidos com dose única, o volume médio na coleta manual foi de 0,24 mL kg⁻¹ (2,5 mg EPC kg⁻¹) (Streit Jr et al., 2008) e 0,20 mL (1-7 mg EPC kg⁻¹) (Arguello et al., 2001), respectivamente. Com duas doses (1,5 e 2,0 mg EPC kg⁻¹) a produção em *M. macrocephalus* foi de 0,19 mL kg⁻¹ (Gutiérrez, 2011). Este valor sobe para 0,4 mL quando os exemplares são sacrificados e o sêmen é coletado diretamente das gônadas (Ribeiro and Godinho, 2003). Com três doses de EPC (0,25, 0,4 e 4,0 mg kg⁻¹), Murgas et al. (1999) coletaram em *Megaleporinus obtusidens* volume

($3,1 \pm 1,2$ mL kg⁻¹) semelhante ao obtido no presente estudo ($3,5 \pm 1,2$ mL kg⁻¹) com dose única (4,0 mg kg⁻¹). O desempenho utilizando gonadorelina foi ainda superior, sendo que os volumes máximos obtidos nas doses 60 (9,2 mL kg⁻¹) e 80 µg kg⁻¹ (8,3 mL kg⁻¹) foram superiores ao registrado para esta espécie (6,0 mL kg⁻¹) (Murgas et al., 1999).

Com exceções pontuais, a concentração espermática, a integridade de membrana, a taxa de motilidade, a velocidade e a linearidade não foram afetadas pela gonadorelina tanto em relação aos peixes não induzidos quanto aos peixes induzidos com EPC.

A baixa taxa de motilidade e o maior percentual de espermatozoides com anormalidades nos peixes tratados com 20 µg kg⁻¹ de gonadorelina quando comparados ao EPC não aparenta ser um efeito negativo causado por subdosagem, visto que estas variáveis foram semelhantes ao controle negativo e nenhuma das variáveis de qualidade foram superiores nos peixes tratados com hormônio independentemente da dose, exceto pelo volume.

A ocorrência de anormalidades morfológicas (primária e secundária somados) foi observada tanto em peixes não induzidos (31,0 %) como em peixes tratados com gonadorelina (16,0-35,0 %) e EPC (20,0 %). Anormalidades primárias e secundárias (12,5 e 25,9 %, respectivamente) também foram registradas para *M. macrocephalus* induzidos com EPC (Moraes et al., 2004). Embora a presença de anormalidades morfológicas seja considerada normal, a taxa não deve exceder um certo limite. Para peixes, não existem limites estabelecidos que indiquem quando uma amostra deve ser descartada, a exemplo do que é recomendado para bovinos e equinos, no qual o índice máximo aceitável de anormalidades para inseminação é de 30,0 % (CBRA, 1998). Entretanto, Miliorini et al. (2011) demonstraram que a taxa de anormalidades crítica para a fecundação de *Prochilodus lineatus* é em torno de 50,0 % em amostras de sêmen criopreservadas, considerando uma razão espermatozoide-ovócito não limitante. Adicionalmente, Streit Jr et al. (2008) relataram uma elevada taxa de anormalidades (primárias e secundárias) antes (56,6 %) e depois (54,7 %) da indução hormonal (2,5 mg EPC kg⁻¹) em *Megaleporinus elongatus*. Embora elevada, a taxa de anormalidades aparentemente não foi afetada diretamente pelo tratamento hormonal.

Considerando o número de peixes que responderam a gonadorelina e a ausência de diferenças significativas na qualidade do sêmen em relação aos peixes não induzidos e os induzidos com EPC, a dose mínima efetiva para *Megaleporinus obtusidens* é de 60 µg kg⁻¹, que pode ser aplicada em uma única injeção.

Nesta dose, o custo para induzir um quilo de peixe (R\$ 5,86) foi menor que para o EPC (R\$ 6,80). A economia de R\$ 0,94 por quilo ao substituir o EPC por gonadorelina pode representar uma importante diferença para o setor produtivo, dependendo da demanda. Além do custo, a disponibilidade da gonadorelina no mercado nacional e a facilidade de manipulação, por se tratar de um produto liofilizado e com concentração conhecida, fazem deste hormônio um substituto confiável e economicamente viável do EPC.

4.1.6 CONCLUSÕES

A gonadorelina aplicada em dose única a partir 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foi eficaz em aumentar o volume de sêmen produzido por *Megaleporinus obtusidens* e pode ser utilizada como substituto do EPC. A economia no custo de indução pode chegar a 14% utilizando a dose de 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

4.1.7 REFERÊNCIAS

- Alarcón, G., Echevarría, L., Llerena, C., Mamani, N., Inga, D., 2015. Evaluación de la efectividad sobre el desove de tres protocolos de inducción hormonal con acetato de buserelina en *Piaractus brachypomus* aplicados en un centro de reproducción de peces amazónicos en Cusco, Perú. Salud y Tecnología Veterinaria 3, 51-57.
- Andrade, E.S., Carvalho, A.S.F., Ferreira, M.R., Paula, F.G., Rodrigues, F.S., Felizardo, V.O., Reis-Neto, R.V., Murgas, L.D.S., 2014. Indutores hormonais na reprodução artificial de curimba (*Prochilodus lineatus*) Revista Brasileira de Reprodução Animal 38, 230-236.
- Arguello, E.L., González, S.H., García, V.J.A., 2001. Reproducción inducida de la liseta *Leporinus muyscorum* (Steindachner, 1902) con extracto pituitario de carpa (EPC). Rev Mvz Cordoba 6, 97-101.
- Blom, E., 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. Fertility and Sterility 1, 176-177.
- CBRA, 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte.
- Chaves-Moreno, L.C., Chacón-Rodríguez, L., Lozada-Morales, J., Mota-Delgado, P.A., Murcia-Ordoñez, B., 2011. Evaluación de la

reproducción inducida de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) con acetato de buserelina. Revista Veterinaria y Zootecnia 6, 47-55.

Felizardo, V.O., Murgas, L.D.S., Andrade, E.S., López, P.A., Freitas, R.T.F., Ferreira, M.R., 2012. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari *Astyanax bimaculatus*. Theriogenology 77, 1570-1574.

Gutiérrez, M.E.M., 2011. Evolução do processo de espermiacão em machos de piau, *Leporinus macrocephalus*, hormonalmente induzidos à reprodução, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, p. 129 f.

Harvey, B.J., Carolsfeld, J., 1993. Induced breeding in tropical fish culture. International Development Research Centre, Ottawa, Canadá.

Kavamoto, E.T., Fogli da Silveira, W., 1986. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições campo. Boletim do Instituto de Pesca 13, 95-100.

Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E., Ollevier, F., 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 130, 425-433.

Mañanós, E., Duncan, N., Mylonas, C., 2008. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish, In: Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P. (Eds.), Methods in Reproductive Aquaculture, CRC Press, Florida, USA, pp. 3-80.

Maria, A.N., Azevedo, H.C., Santos, J.P., Carneiro, P.C.F., 2011. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. Zygote 20, 39-43.

Miliorini, A.B., Murgas, L.D.S., Rosa, P.V., Oberlender, G., Pereira, G.J.M., da Costa, D.V., 2011. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. Aquac Res 42, 177-187.

Moraes, G.V., Streit Jr, D.P., Ribeiro, R.P., Sakaguti, E.S., Souza, E.D.d., Povh, J.A., 2004. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozoides de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). Boletim do Instituto de Pesca 30, 109-116.

Muniz, J.A.S.M., Catanho, M.T.J.D., Santos, A.J.G., 2008. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Bol Inst Pesca 34, 205-211.

Murgas, L.D.S., Miliorini, A.B., Silva, M.O.B., Franciscatto, R.T., Maria, A.N., 2002. Viabilidade seminal de Piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen à 4 °C. Revista Brasileira de Reprodução Animal 26, 211-213.

Murgas, L.D.S., Silva, M.O.B., Mello, C.B.M., Kabeya, D.M., Santana, G.M., 1999. Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). Revista Brasileira de Reprodução Animal 23, 246-248.

Mylonas, C.C., Gissis, A., Magnus, Y., Zohar, Y., 1997. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment wit. Aquaculture 153, 301-313.

Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2000. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. Rev Fish Biol Fisher 10, 463-491.

Mylonas, C.C., Duncan, N.J., Asturiano, J.F., 2017. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. Aquaculture 472, 21-44.

Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., França, L.R., 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. Fish Physiol Biochem 35, 197-206.

Orfão, L.H., 2013. Indução da desova e espermição de peixes em criações comerciais. Revista Brasileira de Reprodução Animal 37, 192-195.

Pardo-Carrasco, S.C., Zaniboni-Filho, E., Arias-Castellanos, J.A., Suárez-Mahecha, H., Atencio-Garcia, V.J., Cruz-Casallas, P.E., 2006. Evaluation of milt quality of the yamú *Brycon amazonicus* under hormonal induction. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 19, 134-139.

Paulino, M.S., Miliorini, A.B., Murgas, L.D.S., Lima, F.S.M., Felizardo, V.O., 2011. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de busserelina. *Boletim do Instituto de Pesca* 37, 39-45.

Rainis, S., Ballestrazzi, R., 2005. The control of reproduction in finfish species through GnRH treatments. *Ital J Anim Sci* 4, 345-353.

Rasband, W.S., 1997-2016. ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.

Reynalte-Tataje, D.A., Esquivel, B.M., Esquivel, J.R., Zaniboni-Filho, E., 2002. Reproducción inducida del piaçu, *Leporinus macrocephalus* Garavello y Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae). *Boletim do Instituto de Pesca* 28, 11-18.

Reynalte-Tataje, D.A., Zaniboni-Filho, E., 2010. Cultivo de piapara, piaçu, piava e piau - gênero *Leporinus*, In: Baldisserotto, B., Gomes, L.d.C. (Eds.), *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*, UFSM, Santa Maria, pp. 73-99.

Ribeiro, R.I.M.A., Godinho, H.P., 2003. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. *Arq Bras Med Vet Zoo* 55, 75-79.

Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Verani, J.R., Vieira, L.J.S., Godinho, H.P., 2000. Induced reproductive responses of the neotropical anostomid fish *Leporinus elongatus* Val. under captive breeding. *Aquac Res* 31, 189-193.

Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocr* 165, 390-411.

Streit Jr, D.P., Moraes, G.V., Ribeiro, R.P., Caçador, W.C., Sakaguti, E.S., Povh, J.A., Souza, E.D.d., 2003. Estudo comparativo da indução hormonal da espermiacção em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. *Acta Scientiarum Animal Sciences* 25, 261-266.

Streit Jr, D.P., Moraes, G.V., Ribeiro, R.P., Povh, J.A., Souza, E.D., Oliveira, C.A.L., 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia* 7, 157-162.

Streit Jr, D.P., Sirol, R.N., Ribeiro, R.P., Moraes, G.V., Vargas, L.D.M., Watanabe, A.L., 2008. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). *Braz. J. Biol.* 68, 373-377.

Viveiros, A.T.M., Fessehay, Y., ter Veld, M., Schulz, R.W., Komen, J., 2002. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 213, 373-386.

Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67, 661-672.

Woynarovich, E., Horváth, L., 1983. A propagação artificial de peixes de águas tropicais. *FAO/CODEVASF/CNPq*, Brasília, Brazil.

Zaniboni-Filho, E., Barbosa, N.D.C., 1996. Priming hormone administration to induce spawning of some brazilian migratory fish. *Revista Brasileira de Biologia* 56, 655-659.

Zaniboni-Filho, E., Nuñez, A.P.O., 2004. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes, In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Eds.), *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*, TecArt, São Paulo, pp. 45-73.

Zaniboni-Filho, E., Weingartner, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 31, 367-373.

Zanuy, S., Carrillo, M., Rocha, A., Molés, G., 2009. Regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleósteos, In: Estévez, M.A.C. (Ed.), La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura, Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, pp. 97-172.

Zar, J.H., 2010. Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey.

4.2 ARTIGO 2 - A OSMOLALIDADE E A COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO ATIVADORA AFETAM A MOTILIDADE DO SÊMEN DE *MEGALEPORINUS OBTUSIDENS*

4.2.1 RESUMO

A compreensão do efeito dos fatores ambientais sobre o comportamento espermático possibilita aumentar a eficiência da reprodução artificial de espécies que dependem destas técnicas para propagação em cativeiro como *Megaleporinus obtusidens*. Este estudo avaliou o efeito da osmolalidade (25, 85, 145, 205, 265 e 325 mOsm kg⁻¹) e da composição de soluções ativadoras (NaCl, KCl e frutose) sobre a taxa de motilidade, velocidade e linearidade do movimento espermático de *Megaleporinus obtusidens*, e determinou a concentração dos principais íons no líquido seminal. Os peixes ($n = 6$) foram selecionados durante o período reprodutivo (Dezembro/2016) e induzidos com uma injeção de gonadorelina (60 µg kg⁻¹). Os íons Na⁺ (74,46 mmol L⁻¹), K⁺ (37,24 mmol L⁻¹) e Cl⁻ (114,29 mmol L⁻¹) foram os mais abundantes no líquido seminal. Em osmolalidade hipertônica (325 mOsm kg⁻¹) em relação ao líquido seminal (293 mOsm kg⁻¹) a motilidade foi inibida. Em todas as soluções os espermatozoides foram ativados em ampla faixa de osmolalidade e variando a osmolalidade, o percentual de células móveis e a duração da motilidade foram afetadas, sendo que nos extremos de pressão osmótica a taxa de motilidade reduziu. Em 145 mOsm kg⁻¹ a taxa de motilidade se manteve entre 45,0 e 71,0 % durante o período pós-ativação avaliado (10–50 s) enquanto em água deionizada (0 mOsm kg⁻¹) o pico (79,0 %) ocorreu aos 10 s e o movimento cessou completamente aos 50 s. O efeito da composição da solução ativadora foi evidenciado quando as variáveis de motilidade foram avaliadas ao longo do tempo pós-ativação. As principais diferenças no comportamento espermático foram produzidas pelo KCl. Em geral, esta solução produziu um aumento progressivo na taxa de motilidade em algumas osmolalidades (85 e 205 mOsm kg⁻¹), velocidades curvilíneas mais altas, baixas velocidades em linha reta, e induziu um movimento circular dos espermatozoides. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a redução na pressão osmótica é o principal gatilho para o início do movimento espermático de *Megaleporinus obtusidens* e que concentrações de KCl superiores a 85 mOsm kg⁻¹ (32,5 mM) afetaram o comportamento dos espermatozoides.

Palavras chave: peixe, Characiformes, qualidade do sêmen, pressão osmótica, CASA

4.2.2 INTRODUÇÃO

Megaleporinus obtusidens (Anostomidae, Characiformes) é uma espécie de peixe de água doce nativa das bacias dos rios Paraná-Paraguai e Uruguai (América do Sul) que anualmente realiza migração reprodutiva [1]. É uma espécie relevante para a pesca comercial e esportiva, principalmente pela qualidade da carne [2], e nos últimos 10 anos ganhou importância como bioindicadora em estudos ecotoxicológicos [3-5]. Em cativeiro sua reprodução é obtida através de técnicas de indução artificial [2].

Assim como na maioria dos teleósteos, os espermatozoides desta espécie permanecem imóveis nos testículos e dutos espermáticos [6], condição que é mantida no líquido seminal devido à presença de compostos inorgânicos (e.g. Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) que conferem elevada osmolalidade à solução e consequentemente impedem a ativação dos espermatozoides, enquanto os constituintes orgânicos (e.g. carboidratos, lipídeos, enzimas, proteínas) nutrem as células e atuam no metabolismo energético dos espermatozoides [7, 8].

A motilidade é um fator preponderante na capacidade de fertilização do espermatozoide e, portanto, é um dos critérios mais importantes na determinação da qualidade do sêmen [9]. O movimento espermático tem início após a diluição do sêmen na água durante a reprodução natural, ou em soluções ativadoras na reprodução artificial, sendo que diferenças entre as características físico-químicas do meio circundante e do líquido seminal regulam a ativação e determinam o comportamento do movimento espermático [10]. A osmolalidade, a concentração iônica [11, 12], a temperatura da água e o pH do meio circundante [13] são alguns dos fatores que influenciam a motilidade, agindo sobre o aparato flagelar na transdução de sinais através da membrana plasmática [14].

Inúmeros são os estudos que demonstram o efeito da osmolalidade e de alguns íons, especialmente K^+ e Ca^{2+} , sobre a motilidade em Cyprinidae [15-21], Salmonidae [22-25] e Acipenseridae [26-28]. Em osmolalidade isotônica à do líquido seminal os espermatozoides de ciprinídeos se mantêm imóveis e o choque hiposmótico é a sinalização necessária para ativar a motilidade. Supressões e reativações consecutivas podem ainda ser obtidas apenas alterando a osmolalidade do meio [15]. Em salmonídeos e esturjões a

redução na concentração extracelular de K^+ é o principal gatilho para o início da motilidade.

O efeito da osmolalidade sobre a inibição e a ativação da motilidade em Characiformes é conhecido apenas para algumas espécies. Soluções de glicose ou NaCl com osmolalidade superior (325 e 365 mOsm kg^{-1}) à do líquido seminal (318 mOsm kg^{-1}) impediram a ativação do sêmen de *Brycon opalinus* e abaixo de 285 mOsm kg^{-1} induziram o movimento espermático [29]. Em *Brycon orthotaenia* o percentual de células móveis variou entre 75 e 90 % em concentrações de NaCl menores do que 75 mM (~ 150 mOsm kg^{-1}) [30]. Para *Brycon insignis*, cuja osmolalidade seminal é 286 mOsm kg^{-1} , a motilidade foi máxima (91 %) entre 68 e 274 mOsm kg^{-1} em NaCl [31]. Soluções de NaCl, glicose ou BTS (Beltsville Thaw Solution) com osmolalidade de até 270 mOsm kg^{-1} e de até 180 mOsm kg^{-1} induziram a motilidade em pelo menos 60 % dos espermatozoides de *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyianus*, respectivamente [32]. Para *Prochilodus lineatus* recentemente foi observado elevado percentual de espermatozoides móveis (> 88%) em sêmen ativado com NaCl (50–150 mOsm kg^{-1}) ou glicose (50–250 mOsm kg^{-1}) [33]. O sêmen de *Colossoma macropomum* ativado em ampla faixa de osmolalidade (50–270) com soluções de NaCl ou $NaHCO_3$ produziu a maior taxa (85 %) e o maior tempo de motilidade (54 s) em 230 mOsm kg^{-1} [34].

Desse modo, verifica-se que, semelhante ao que já foi descrito para ciprinídeos, estes estudos sugerem que a redução da pressão osmótica é o fator desencadeador do movimento espermático em Characiformes, ao menos para espécies das famílias Bryconidae, Prochilodontidae e Serrasalminidae.

Diversos tipos de soluções ativadoras são utilizados na avaliação da qualidade do sêmen, sendo a mais comum a água (destilada, deionizada, poço ou da rede pública), que normalmente apresenta osmolalidade próxima de zero. Formulações constituídas por um único sal (NaCl, KCl, $NaHCO_3$, $CaCl_2$) ou por carboidratos (glicose, sacarose, manitol), até soluções compostas pela combinação destes solutos, adicionadas pequenas concentrações de outros sais (e.g. $MgSO_4$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4) são empregadas com o objetivo de aumentar a taxa de motilidade e prolongar o tempo de ativação.

A resposta dos espermatozoides a diferentes pressões osmóticas e soluções ativadoras possibilita compreender o efeito de fatores ambientais sobre o comportamento espermático e aumentar a eficiência da reprodução artificial e das técnicas de criopreservação [11, 21].

Para *Megaleporinus obtusidens* não existem informações sobre a composição do líquido seminal ou do efeito de fatores externos sobre o comportamento dos espermatozoides. Portanto, este estudo determinou a concentração dos principais íons do líquido seminal, e avaliou o efeito de soluções eletrolíticas e não eletrolíticas com diferentes osmolalidades sobre a taxa de motilidade, a velocidade e o tipo de trajetória dos movimentos espermáticos do sêmen de *Megaleporinus obtusidens*.

4.2.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.3.1 OS PEIXES E A COLETA DO SÊMEN

Megaleporinus obtusidens ($n = 6$; $785,3 \pm 182,6$ g) com sete anos de idade que liberaram sêmen sob leve pressão abdominal foram selecionados durante o período reprodutivo (dezembro/2016) em um viveiro do Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú (EPAGRI-CEDAP, Camboriú, SC, $27^{\circ}0'49.22''$ S; $48^{\circ}39'49.41''$ W) e transportados para o Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD-UFSC, Florianópolis, SC, $27^{\circ}43'44.57''$ S; $48^{\circ}30'32.64''$ W).

Esses peixes foram submetidos a indução hormonal com uma injeção única de gonadorelina ($60 \mu\text{g kg}^{-1}$), e após 200 horas-grau (25°C) o sêmen foi coletado por pressão abdominal com auxílio de seringas, tomando as devidas precauções para evitar contaminação com urina, muco e fezes.

Após a coleta, o sêmen foi transferido para tubos tipo Eppendorf e mantidos em caixa de isopor com placas de gel térmico ($9\text{--}13^{\circ}\text{C}$). As análises foram realizadas imediatamente após a coleta do sêmen, sendo que o tempo decorrido entre a coleta e o término das análises de cada amostra foi de aproximadamente três horas.

Todos os procedimentos e manejos experimentais dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo CEUA nº PP00788; Anexo A).

4.2.3.2 SOLUÇÕES ATIVADORAS

Foram preparadas soluções eletrolíticas com os sais NaCl e KCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) e não eletrolítica com frutose (Labsynth, Diadema – SP, Brasil) nas osmolalidades 25, 85, 145, 205, 265 e 325 mOsm kg^{-1} . Os solutos foram diluídos em água deionizada contendo 20 mM TRIS-HCl ($\text{pH } 8,2$) 24h antes do experimento e as

soluções foram estocadas à temperatura ambiente (24–25 °C) em frascos plásticos (PP).

4.2.3.3 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA

As variáveis de motilidade espermática foram obtidas através da análise computacional assistida (CASA). O sêmen foi ativado por diluição na proporção de 1:1.700 (sêmen:volume total), em seguida 10 µL da mistura foram pipetados em uma câmara de Neubauer coberta com lamínula e posicionada em microscópio de luz ($\times 10$, Leica DMLB, Bannockburn, IL, USA).

O sêmen de cada animal foi ativado com cada uma das soluções ativadoras, selecionadas aleatoriamente, e o movimento dos espermatozoides foi gravado durante 1s aos 10, 20, 30, 40 e 50 s pós-ativação utilizando uma câmara CMOS (Basler A602fc, Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Alemanha) ajustada para uma taxa de captura de 100 quadros por segundo (fps). A compilação dos vídeos e a análise utilizando o *plugin* CASA [35] para o software ImageJ [36] seguiu o protocolo proposto por Kime et al. [37] e Wilson-Leedy and Ingermann [35].

As variáveis quantificadas foram a taxa de motilidade, a velocidade curvilínea (VCL), a velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), a velocidade em linha reta (VSL) e a linearidade. Os valores iniciais de configuração do plugin estão apresentados no apêndice A.

Para verificar a viabilidade do sêmen e avaliar se o tamponamento com TRIS-HCL afeta a motilidade, cada amostra foi inicialmente ativada com água deionizada (0 mOsm kg⁻¹) e com água deionizada tamponada (20 mM TRIS-HCl; 20 mOsm kg⁻¹; pH 8,2).

4.2.3.4 CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN E DO LÍQUIDO SEMINAL

Uma alíquota de 10 µL de sêmen fresco foi diluída (1:1000, sêmen:volume total) em solução de formol-citrato (2,9 g de citrato de sódio e 1,0 mL de formaldeído 40% em 100 mL água deionizada) para análise da concentração espermática e da presença de anormalidades morfológicas.

A concentração espermática foi determinada através da contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer [38], e a presença de anormalidades morfológicas foi quantificada pelo método de coloração

com corante rosa de bengala (3,0 %) [39]. Uma alíquota de 100 μL de sêmen fixado foi misturado a 5,0 μL do corante, e em seguida foi preparada uma extensão e 200 células foram analisadas em microscópio de luz ($\times 1000$). Células íntegras que não apresentaram cauda quebrada, enrolada, curta, degenerada, corrugada, dobrada e solta foram consideradas espermatozoides normais [40].

A integridade da membrana celular foi avaliada pelo método de coloração eosina-nigrosina [41]. Uma alíquota de 10 μL de sêmen fresco foi diluída em 90 μL de solução de NaCl (200 mM). Em seguida 10 μL desta diluição foram adicionados à 40 μL de eosina b (3,0 %) e 50 μL de nigrosina (5,0 %). Uma lâmina de extensão foi preparada e 200 espermatozoides foram contados em microscópio de luz ($\times 400$), sendo que as células que não coraram foram consideradas íntegras [42].

Após a avaliação da motilidade, o sêmen restante foi centrifugado em 8000 g (~ 5800 rpm; Centrifuge 5424, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) por 15 min, e o líquido seminal sobrenadante foi coletado e congelado (-20°C) até as análises.

A osmolalidade do líquido seminal foi determinada em osmômetro crioscópico (PLZ-1000, PLZ, Londrina, PR, Brasil). As concentrações do Na^+ e K^+ foram determinadas por eletrodo seletivo de íons (RapidLab 348, Bayer HealthCare LLC, East Walpole, USA), e o Ca^{2+} , o Mg^{2+} e o Cl^- foram quantificados por turbidimetria (CB400i, Wiener Lab Group, Rosário, Argentina).

O pH do líquido seminal foi mensurado com peagômetro de bancada microprocessado (TEC-5, Tecnal Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil).

4.2.3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar se o tamponamento da água (20mM TRIS-HCl) afetou a ativação do sêmen, a relação entre a taxa de motilidade e o tempo pós-ativação foi determinada através da análise de regressão linear, para a qual os coeficientes angular e linear foram comparados com o modelo ajustado aos dados de motilidade ativada com água deionizada através da análise de covariância [43].

As variáveis VCL, VAP e VSL foram submetidas a análise de correlação e devido à forte correlação positiva entre VCL e VAP (Pearson $r = 0,85$; $P < 0,01$; $n = 393$), apenas a VCL e a VSL foram apresentadas como descritoras das velocidades. Nos tratamentos em que a taxa de motilidade média foi inferior a 8,0 %, os dados de velocidade e

linearidade ficaram superestimados e, portanto, foram excluídos das análises.

A taxa de motilidade, a VCL, a VSL e a linearidade foram submetidas à análise de variância de modelo misto com medidas repetidas [44], sendo o tempo pós-ativação a medida repetida (MIXED procedure no SPSS).

Inicialmente, o efeito da osmolalidade sobre a taxa de motilidade foi avaliado para cada solução isoladamente, utilizando a osmolalidade como fator fixo. Quando o efeito foi significativo, a relação entre a osmolalidade e a taxa de motilidade foi determinada através da análise de regressão [43].

Um segundo modelo foi estruturado e aplicado a todas as variáveis para avaliar o efeito da composição da solução ativadora (frutose, NaCl ou KCl) em cada uma das osmolalidades, utilizando a solução ativadora como fator fixo. Quando o efeito foi significativo, comparações múltiplas par a par com ajuste de Sidak foram realizadas em cada tempo pós-ativação. Em ambos os modelos, a interação entre os fatores foi incluída. A estrutura de covariância autorregressiva (AR1) e o método Restrição de Máxima Verossimilhança (REML) foram utilizados para a estimação dos modelos [44].

4.2.4 RESULTADOS

4.2.4.1 CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN E DO LÍQUIDO SEMINAL

As características do sêmen como a concentração, o percentual de espermatozoides morfolologicamente normais e com membrana íntegra, e do líquido seminal como a concentração dos principais íons, a osmolalidade e o pH estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Características do sêmen e do líquido seminal de *Megaleporinus obtusidens* ($n = 6$).

Características seminais	média \pm DP
Espermatozoides normais (%)	74,5 \pm 6,1
Membrana íntegra (%)	78,9 \pm 3,9
Concentração ($\times 10^{10}$ células mL ⁻¹)	2,85 \pm 0,34
Na ⁺ (mmol L ⁻¹)	74,46 \pm 21,73
K ⁺ (mmol L ⁻¹)	37,24 \pm 11,72
Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	3,51 \pm 0,42
Mg ²⁺ (mmol L ⁻¹)	2,09 \pm 0,22
Cl ⁻ (mmol L ⁻¹)	114,29 \pm 26,92
Osmolalidade (mOsm kg ⁻¹)	293,25 \pm 11,53
pH	8,9 \pm 0,1

4.2.4.2 MOTILIDADE ESPERMÁTICA

A motilidade em água deionizada (Motilidade = $-2,18 \times \text{Tempo} + 100,70$; $R^2 = 0,95$; $P < 0,05$) e em água contendo 20 mM TRIS-HCl (Motilidade = $-2,03 \times \text{Tempo} + 93,48$; $R^2 = 0,96$; $P < 0,05$) foi a mesma, uma vez que os coeficientes angulares ($F_{1,6} = 0,149$; $P > 0,05$) e lineares ($F_{1,7} = 0,283$; $P > 0,05$) desses diluentes foram semelhantes. A taxa de motilidade decaiu significativamente de 79,0 % para menos de 5,0 % entre 10 e 40 s pós-ativação e aos 50 s, o movimento dos espermatozoides cessou completamente em ambos os diluentes.

O sêmen de *Megaleporinus obtusidens* foi ativado em uma ampla faixa de osmolalidade em solução não eletrolítica (frutose) e em soluções eletrolíticas (NaCl e KCl) (Fig. 1). Com frutose e NaCl a motilidade foi inibida em 325 mOsm kg⁻¹ enquanto que com KCl não foram observados espermatozoides móveis a partir de 265 mOsm kg⁻¹.

A taxa de motilidade foi afetada ($P < 0,05$) pela osmolalidade, quando frutose, NaCl ou KCl foram utilizadas como solução ativadora (Fig. 1). Em resposta ao aumento na osmolalidade, a taxa de motilidade pôde ser descrita por uma função quadrática. Os parâmetros das regressões e os vértices das curvas estão apresentados na Tabela 6.

Em baixa osmolalidade (25 mOsm kg⁻¹) o movimento espermático cessou aos 50 s e a composição da solução ativadora não apresentou influência sobre a motilidade ($P > 0,05$) ao longo do tempo (Fig. 2). A partir de 85 mOsm kg⁻¹, diferenças significativas no padrão de variação temporal da motilidade foram evidenciadas entre as soluções (interação significativa entre os fatores solução e tempo na análise de variância). Na ativação com KCl houve um aumento progressivo da motilidade até 30–40 s pós-ativação nas osmolalidades 85 e 205 mOsm kg⁻¹ (Fig. 2). Em 145 mOsm kg⁻¹, o percentual de espermatozoides móveis se manteve acima de 45,0 % durante todo o período pós-ativação avaliado (10–50 s), exceto aos 50 s para o NaCl (Fig. 2).

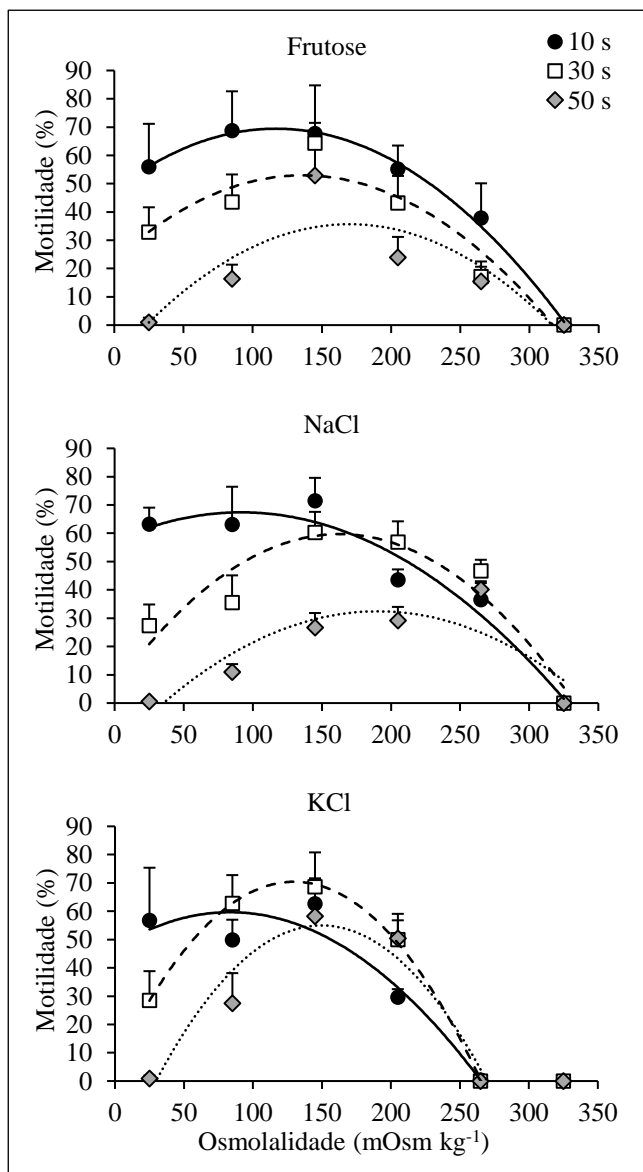


Fig. 1. Efeito da osmolalidade sobre a taxa de motilidade (média \pm DP, $n = 6$) dos espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens* ativados com frutose, NaCl ou KCl aos 10 (linha contínua), 30 (linha segmentada) e 50 s (linha pontilhada) pós-ativação.

Tabela 6. Parâmetros das regressões ajustadas para a taxa de motilidade do sêmen de *Megaleporinus obtusidens* ($n = 36$).

Tempo pós-ativação	Solução	Constante		Coeficientes		R^2	F	Vértices	
		B0		B1	B2			Osmolalidade (mOsm kg ⁻¹)	Motilidade (%)
10 s	Frutose	47,833		0,371	-0,002	0,808	66,032	92,8	65,0
	NaCl	58,113		0,212	-0,001	0,869	87,581	106,0	69,3
	KCl	48,064		0,266	-0,002	0,780	46,649	66,5	56,9
30 s	Frutose	15,929		0,605	-0,002	0,659	23,203	151,3	61,7
	NaCl	6,900		0,635	-0,002	0,769	47,703	158,8	57,3
	KCl	6,020		0,992	-0,004	0,901	115,009	124,0	67,5
50 s	Frutose	-16,833		0,668	-0,002	0,598	18,085	167,0	38,9
	NaCl	-13,321		0,464	-0,001	0,716	32,570	232,0	40,5
	KCl	-29,937		1,126	-0,004	0,828	65,850	140,8	49,3

Motilidade = $B0 + B1 \times \text{Osmolalidade} + B2 \times \text{Osmolalidade}^2$; * $P < 0,05$.

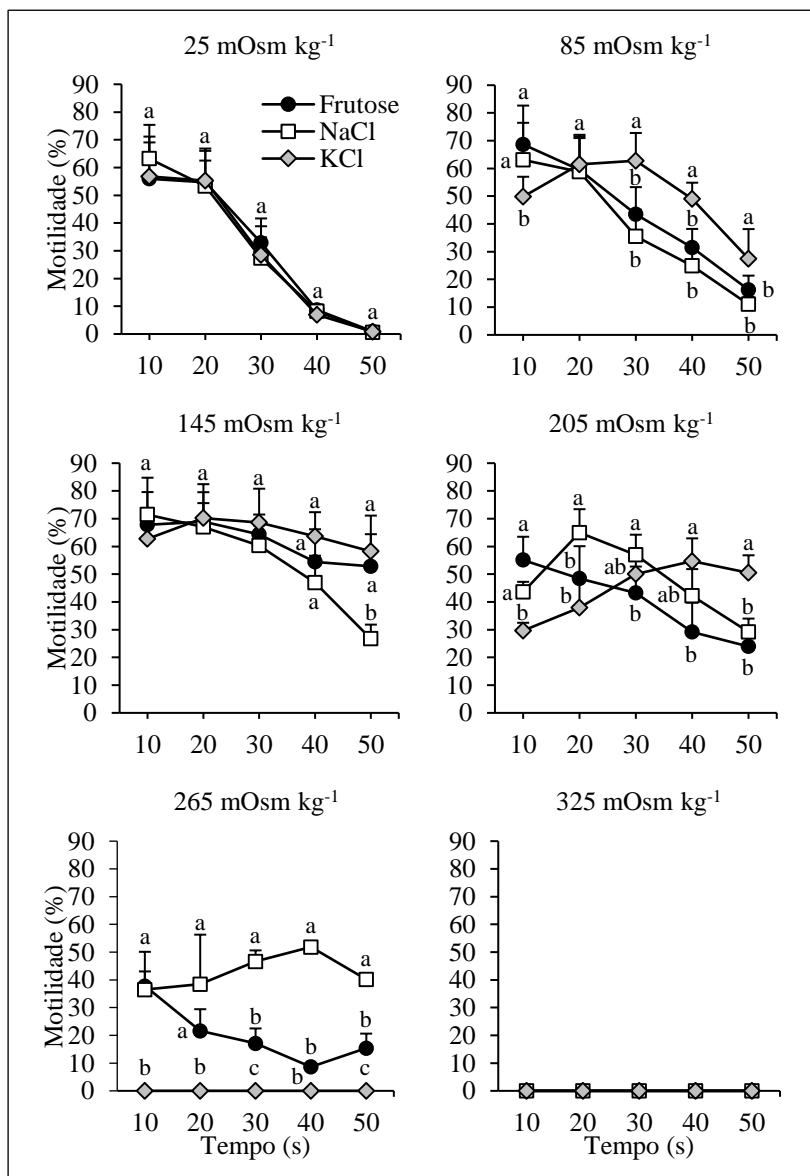


Fig. 2. Efeito da frutose, NaCl e KCl sobre a taxa de motilidade (média \pm DP, $n = 6$) dos espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens* avaliados ao longo do tempo pós-ativação nas osmolaridades 25, 85, 145, 205, 265 e 325 mOsm kg⁻¹. Letras diferentes em cada tempo pós-ativação indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre soluções.

A redução da VCL ao longo do tempo foi semelhante ($P > 0,05$) entre as soluções na osmolalidade 25 mOsm kg⁻¹ (Fig. 3). Em todas as osmolalidades, os efeitos do NaCl e da frutose sobre a VCL foram semelhantes ($P > 0,05$). Entre 85 e 205 mOsm kg⁻¹, a solução de KCl induziu aumento ($P < 0,05$) da VCL na maioria dos tempos pós-ativação. Independentemente da solução, a VCL atingiu um platô entre 70 e 90 $\mu\text{m s}^{-1}$ ao final do período pós-ativação (40–50 s).

O comportamento da VSL ao longo do tempo pós-ativação diferiu ($P < 0,05$) entre as soluções, independentemente da osmolalidade (Fig. 4). A partir de 85 mOsm kg⁻¹, os espermatozoides ativados com KCl apresentaram VSL baixa e aproximadamente constante ($\sim 30 \mu\text{m s}^{-1}$). No entanto, em média, as maiores VSL foram produzidas utilizando-se NaCl como solução ativadora.

A composição da solução ativadora influenciou ($P < 0,05$) a linearidade do movimento espermático ao longo do tempo a partir de 85 mOsm kg⁻¹ (Fig. 5). Nas amostras ativadas com solução eletrolítica a linearidade aumentou progressivamente no decorrer do tempo ($P < 0,05$). Já com frutose, as médias se mantiveram no mesmo patamar durante todo o período ($P > 0,05$). Independentemente da osmolalidade, os espermatozoides ativados com NaCl ou frutose se deslocaram em uma trajetória aproximadamente linear (linearidade $\geq 0,8$; Fig. 6A) ou aleatória ($0,4 < \text{Linearidade} < 0,8$; Fig. 6B) enquanto que o KCl induziu um movimento predominantemente circular (Linearidade $\leq 0,4$; Fig. 6C).

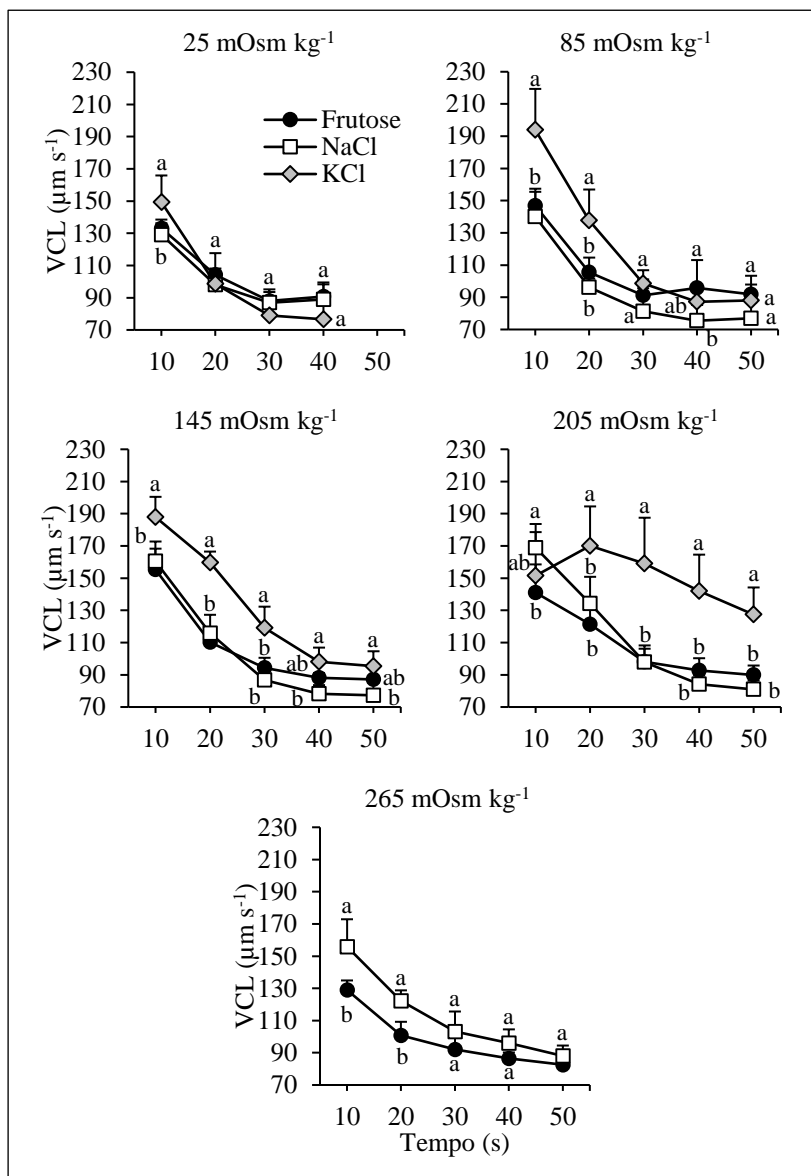


Fig. 3. Efeito da frutose, NaCl e KCl sobre a velocidade curvilínea (VCL; média \pm DP, $n = 6$) dos espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens* avaliados ao longo do tempo pós-ativação nas osmolalidades 25, 85, 145, 205 e 265 mOsm kg^{-1} . Letras diferentes em cada tempo pós-ativação indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre soluções.

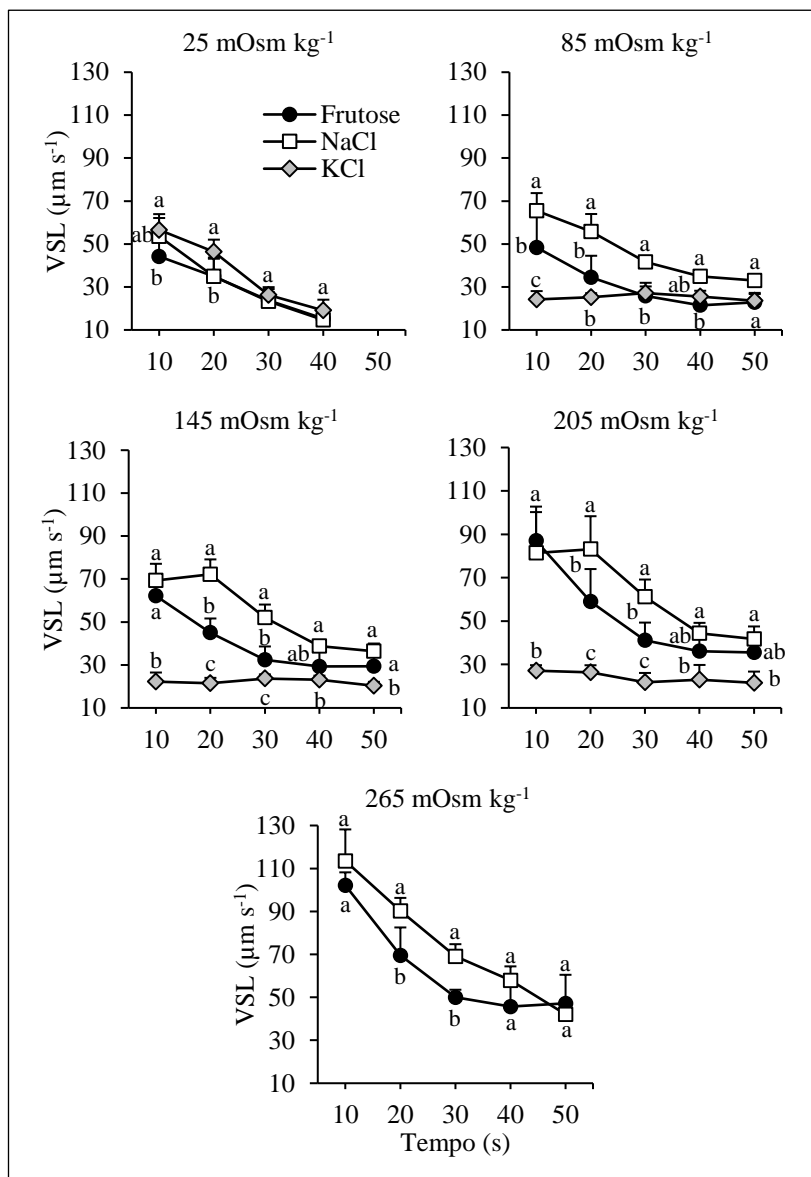


Fig. 4. Efeito da frutose, NaCl e KCl sobre a velocidade linear (VSL; média \pm DP, $n = 6$) dos espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens* avaliados ao longo do tempo pós-ativação nas osmolalidades 25, 85, 145, 205 e 265 mOsm kg⁻¹. Letras diferentes em cada tempo pós-ativação indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre soluções.

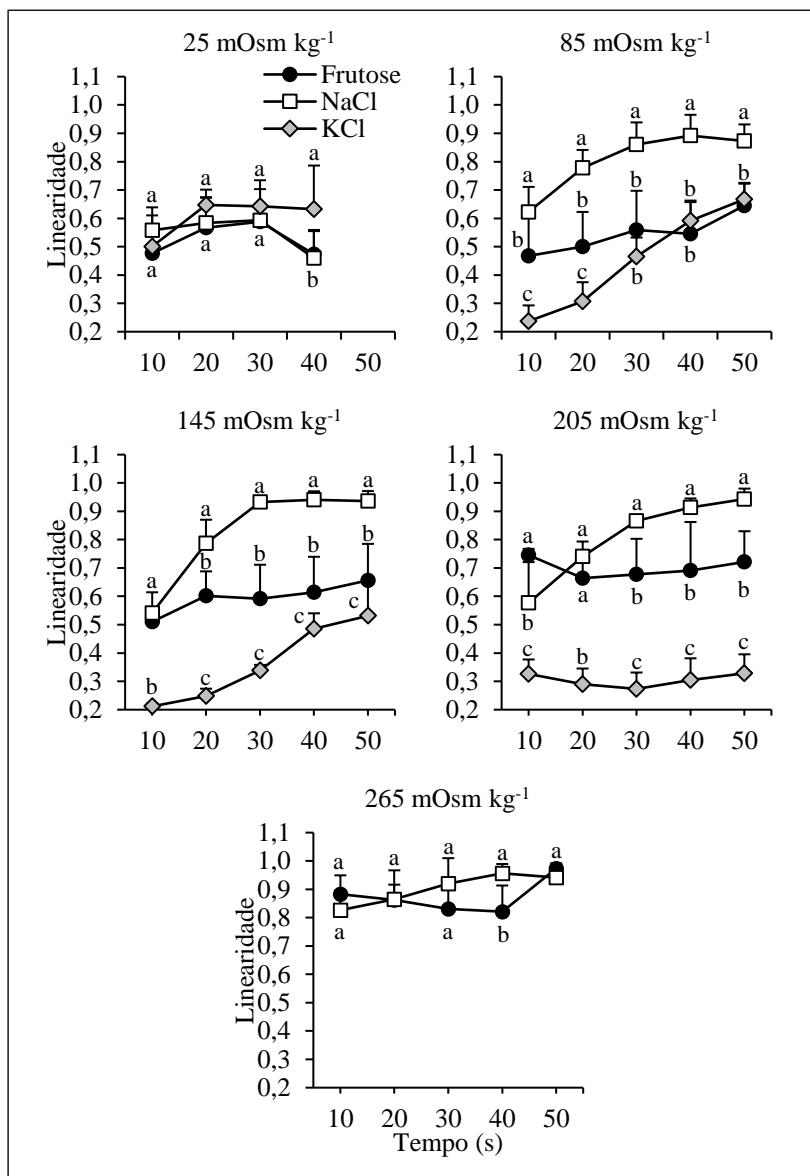


Fig. 5. Efeito da frutose, NaCl e KCl sobre a linearidade do movimento (média \pm DP, $n = 6$) espermático de *Megaleporinus obtusidens* avaliada ao longo do tempo pós-ativação nas osmolalidades 25, 85, 145, 205 e 265 mOsm kg⁻¹. Letras diferentes em cada tempo pós-ativação indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre soluções.

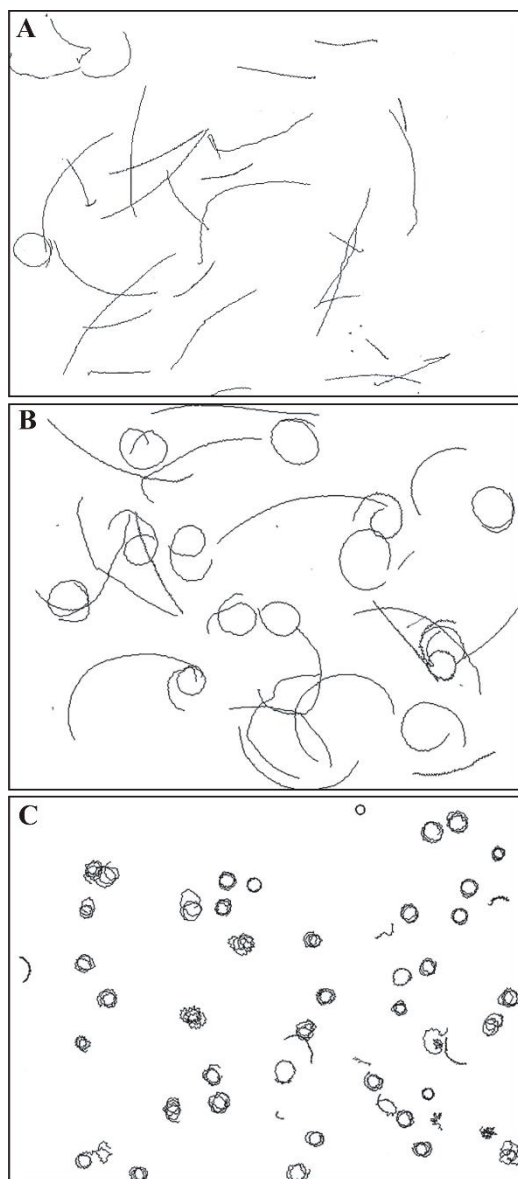


Fig. 6. Trajetória de espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens* ativados com NaCl ou frutose apresentando linearidade $\geq 0,8$ (A) ou entre 0,4 e 0,8 (B). O item (C) representa a trajetória de espermatozoides ativados com KCl, com linearidade $\leq 0,4$.

4.2.5 DISCUSSÃO

Os componentes do líquido seminal possuem papel preponderante no metabolismo, sobrevivência e motilidade dos espermatozoides [7, 11] e, dentre esses componentes, os íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Cl^- atuam no balanço osmótico e mantém os espermatozoides imóveis até seu contato com a água [7]. Para espécies de peixes Neotropicais brasileiros, no entanto, a bioquímica do sêmen é pouco conhecida.

Os íons Na^+ , K^+ e Cl^- foram os mais abundantes no líquido seminal de *Megaleporinus obtusidens*, a exemplo do registrado para outros teleosteos [8, 21, 45, 46], sendo que as concentrações encontradas então dentro do intervalo relatado para ciprinídeos ($64\text{--}110\text{ mmol L}^{-1}$ de Na^+ ; $25\text{--}51\text{ mmol L}^{-1}$ de K^+ ; $110\text{--}253\text{ mmol L}^{-1}$ de Cl^-) [8, 47]. A osmolalidade seminal de 293 mOsm kg^{-1} , que resulta principalmente da elevada concentração destes íons, está incluída na faixa já conhecida ($230\text{--}346\text{ mOsm kg}^{-1}$) para peixes de água doce [8, 9, 11, 12, 21, 29, 32, 33].

Em osmolalidade hipertônica (325 mOsm kg^{-1}) à do líquido seminal, os espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens* permaneceram imóveis. A motilidade somente foi ativada por choque hiposmótico, tanto em soluções eletrolíticas quanto em não eletrolítica, o que indica que a pressão osmótica do ambiente aquoso onde os espermatozoides são liberados é o gatilho para o início da motilidade [11]. Estes resultados corroboram com o padrão bem documentado para ciprinídeos [8, 20, 21] e para algumas espécies nativas de peixes brasileiros de água doce [29, 31-33].

Na maioria das espécies de água doce o movimento espermático tem duração inferior a 2 min [37], característica também observada no sêmen de *Megaleporinus obtusidens*, cuja motilidade cessou aos 50 s após a ativação com água deionizada ou em baixa osmolalidade, condição que independe da solução. Quando a osmolalidade da solução ativadora variou, o percentual de células móveis e a duração da motilidade foram afetados, sendo que nos extremos de pressão osmótica a taxa de motilidade foi mais baixa. Este efeito parabólico da taxa de motilidade em resposta ao aumento da osmolalidade foi mais evidente aos 30 e 50 s pós-ativação, semelhante ao observado para *Vimba vimba* entre 30 e 60 s pós-ativação [20].

A exposição dos espermatozoides a osmolalidades extremamente baixas pode causar danos ao flagelo e reduzir o tempo de motilidade [20, 48, 49]. Durante a ativação em água destilada, a estrutura celular

dos espermatozoides de *Cyprinus carpio* sofre um aumento considerável de volume e um encurtamento progressivo do flagelo devido ao enrolamento do axonema a partir da porção distal, o que reduz a eficiência do seu batimento [50]. Em outras espécies a formação de bolhas citoplasmáticas em toda a extensão do flagelo já foi relatada, o que dificulta a propagação da onda [48] e reduz a motilidade. A diluição progressiva do meio citoplasmático devido ao influxo de água, e uma subsequente redução da concentração de metabólitos, como ATP e fosfocreatina, talvez possam interferir na motilidade através de alterações na ação da dineína do axonema [50], o que também reduziria a duração da motilidade. No outro extremo, alterações nos fluxos iônicos essenciais para a ativação podem explicar a baixa taxa de motilidade em osmolalidades elevadas [20].

Segundo Cosson [12], soluções ativadoras que induzem uma boa ativação sem expor os espermatozoides a condições osmóticas extremas prolongam a motilidade, o que é consistente com os resultados obtidos nas osmolalidades intermediárias (145–205 mOsm kg⁻¹) para *Megaleporinus obtusidens*. Na pressão osmótica 145 mOsm kg⁻¹, que correspondente a aproximadamente 50,0 % da osmolalidade seminal (293 mOsm kg⁻¹), além do percentual de células ativas se manter em um mesmo patamar (60,0–70,0 %) na maior parte do tempo pós-ativação, o efeito da composição da solução ativadora ocorreu tardiamente (50 s). Neste caso, resta ainda avaliar se nessa pressão osmótica seria possível aumentar o sucesso na fertilização artificial de *Megaleporinus obtusidens*, como registrado para *Rhamdia quelen*, para a qual uma solução de frutose a 2,3 % (~ 130 mOsm kg⁻¹) foi capaz de produzir uma elevada taxa fertilização com uma menor proporção de espermatozoides por ovócito [51].

O intervalo em que a concentração osmótica produz as melhores respostas para os parâmetros de motilidade (taxa, velocidade e duração) difere entre as espécies de peixes. Em espécies brasileiras de água doce, uma ativação com alta taxa de motilidade e velocidade, e por um período maior de tempo é obtida em osmolalidades entre 100 e 150 mOsm kg⁻¹ [32, 33, 51]. Nestas osmolalidades, a fosforilação oxidativa parece ser o processo metabólico responsável por suprir a demanda de ATP e consequentemente prolongar o período de motilidade [52, 53].

Estudos envolvendo espécies cujo sêmen é ativado pela redução da osmolalidade demonstraram não haver diferenças na ativação e supressão da motilidade utilizando soluções iônicas e não-iônicas numa mesma osmolalidade [29, 32, 34, 54]. Ao contrário, levando-se em consideração a motilidade ao longo do tempo, os resultados do presente

estudo evidenciaram o efeito da composição da solução ativadora sobre a cinética do movimento espermático (taxa de motilidade, velocidade e linearidade), produzindo diferenças no padrão de resposta entre as soluções (interação entre solução e tempo). Em parte, variações entre espécies na resposta dos espermatozoides a diferentes soluções ativadoras podem ser explicadas por diferenças na concentração iônica, especialmente de K^+ e Ca^{2+} , do líquido seminal [25, 49].

Para *Megaleporinus obtusidens* ficou claro que o K^+ desempenha um papel importante na motilidade dos espermatozoides, e sua influência foi perceptível em todas as variáveis de motilidade a partir de 85 mOsm kg^{-1} (32,5 mM KCl): 1) A motilidade foi inibida em osmolalidade hipotônica (265 mOsm kg^{-1}) em relação ao líquido seminal (293 mOsm kg^{-1}), enquanto nas demais soluções os espermatozoides permaneceram móveis; 2) Foi observado um retardo na ativação de parte dos espermatozoides, sendo que as taxas de motilidade atingiram o máximo apenas 30–40 s após a ativação, especialmente em 205 mOsm kg^{-1} ; 3) O K^+ também afetou a trajetória do movimento espermático induzindo um deslocamento circular cujo efeito foi refletido no aumento significativo da VCL e na redução da linearidade e da VSL.

Vários estudos avaliaram o efeito dos íons na ativação dos espermatozoides [11, 12] e alguns modelos foram propostos para explicar a influência dos fatores ambientais [10]. Embora o papel específico de cada íon muitas vezes seja difícil de distinguir, existe um consenso de que a redução na concentração intracelular de K^+ é necessária para a ativação dos espermatozoides, tanto em ciprinídeos quanto em salmonídeos [14].

Em ciprinídeos, o choque hiposmótico seguido pela redução na concentração extracelular de K^+ após a diluição do sêmen na água, desencadeiam a abertura dos canais de K^+ e o efluxo de K^+ , respectivamente [16]. A membrana é, consecutivamente, hiperpolarizada e ativa os canais de Ca^{2+} permitindo o influxo de Ca^{2+} [16, 55]. O aumento intracelular de Ca^{2+} além de ativar outros canais e moléculas sinalizadoras, modula a assimetria do batimento flagelar que finalmente direciona a trajetória do movimento [55]. De acordo com Morita et al. [56], quando a simetria do batimento flagelar aumenta os espermatozoides nadam em círculos. Além disso, a importância do efluxo de K^+ na ativação é reforçada pelas descobertas de Krasznai et al. [17], os quais demonstraram que em *Cyprinus carpio* um bloqueador de canais voltagem-dependentes de K^+ (4-aminopiridina, 4-AP) impediu a

hiperpolarização da membrana plasmática após o choque hiposmótico e inibiu a motilidade espermática.

Uma maior sensibilidade ao K^+ tem sido reportada para salmonídeos. Baixas concentrações de K^+ são suficientes para inibir a motilidade em *Salmo trutta trutta* (8 mM) [24], *Onchorynchus mykiss* e *Onchorynchus masou* (10 mM) [22]. O efluxo de K^+ intracelular e o influxo de Ca^{2+} também estão envolvidos na ativação [57]. A redução gradual do potencial elétrico da membrana plasmática (hiperpolarização) ocorre concomitantemente com a redução gradual da concentração extracelular de K^+ , estimulando a síntese de monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico), que por sua vez desencadeia os demais eventos que iniciam a motilidade espermática [22]. Também foi demonstrado que a ativação dos espermatozoides em soluções contendo concentrações crescentes de K^+ causa uma redução progressiva na amplitude da hiperpolarização da membrana e na síntese de AMP cíclico [57].

O mecanismo pelo qual o K^+ afetou a motilidade do sêmen de *Megaleporinus obtusidens* carece de elucidação. É plausível que a redução no gradiente de K^+ entre o interior do espermatozoide e a solução ativadora rica em K^+ , com o aumento da osmolalidade, possa o reduzir o efluxo de K^+ , mesmo que a pressão osmótica permita a abertura dos canais de K^+ . Um menor fluxo poderia influenciar a hiperpolarização/despolarização da membrana plasmática, atrasando o início da motilidade, bem como poderia alterar a cadeia de eventos sucessivos que controlam o batimento do flagelo, modificando a trajetória do movimento.

Em osmolalidade elevada (265 mOsm kg^{-1}) foram registradas diferenças na taxa de motilidade e velocidade (VCL e VSL) entre solução eletrolítica (NaCl) e não eletrolítica (frutose), cuja causa ainda não foi definida. Divergências no padrão de motilidade entre NaCl e glicose foram observadas para *Prochilodus lineatus* em faixa elevada de osmolalidade [33], sendo que entre 200 e 250 mOsm kg^{-1} a taxa de motilidade, a velocidade e a duração da motilidade foram maiores em amostras ativadas com glicose em comparação com NaCl. Para *Megaleporinus obtusidens* ocorreu o inverso; em 265 mOsm kg^{-1} , o percentual de espermatozoides móveis e a velocidade (VCL e VSL) foram maiores em NaCl na maioria dos tempos pós-ativação, resultado semelhante ao registrado para *Esox lucius*, para a qual as velocidades em NaCl foram superiores às produzidas por soluções de manitol e sacarose para uma mesma osmolalidade [48]. Em estudo com três espécies de teleosteos indonésios, a maior taxa de motilidade

espermática para *Puntius javanicus* e *Oxyleotris marmorata* foi produzida por ativação em NaCl e manitol, respectivamente, enquanto que para *Clarias batrachus* não houve diferença entre as soluções [56]. Estas variações sugerem que o efeito da composição da solução ativadora é espécie-específico, possivelmente associado à composição do líquido seminal e aos mecanismos de ativação da motilidade.

A linearidade em soluções salinas aumentou no decorrer do tempo. Esta variável tem sido pouco analisada em estudos envolvendo o efeito da osmolalidade e raramente é determinada ao longo do tempo. Ela representa a trajetória do deslocamento e deriva da razão entre VSL e VAP [35]. Durante o período de motilidade a movimentação do axonema produz ondas ao longo do flagelo que impulsionam e direcionam o espermatozoide [55]. Em condições adequadas de ativação, a quantidade, a frequência e a amplitude destas ondas determinam, dentre outros fatores, a velocidade e a trajetória do movimento [48]. Como o mecanismo é limitado principalmente pela quantidade de ATP capaz de ser gerada [14, 58], à medida em que o estoque energético é consumido, o número de ondas aumenta e a amplitude e o comprimento das ondas reduzem fazendo com que a velocidade também reduza [48, 52, 53]. Com o cessar progressivo do movimento e as alterações na propagação das ondas, é esperado que a trajetória também seja afetada, o que poderia justificar a linearização do deslocamento ao final do período de motilidade. No entanto, a razão pela qual a frutose não produziu variações temporais da linearidade precisa ser investigada.

Além do conteúdo intracelular de ATP e dos parâmetros de onda, a velocidade espermática é influenciada pelo tamanho do espermatozoide (diâmetro da cabeça e comprimento do flagelo), pelo peso corporal do reprodutor, pela concentração iônica (Na^+ e Cl^-) do líquido seminal [59] e pela osmolalidade e composição da solução ativadora [33, 48]. Não há informações sobre a concentração de ATP ou sobre as características morfológicas em espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens*, entretanto, o presente estudo demonstrou variações na velocidade em função da interação entre a composição da solução e o tempo pós-ativação em ampla faixa de osmolalidade. Em geral, o intervalo em que as velocidades variaram (VCL: 129–194 $\mu\text{m s}^{-1}$; VSL: 22–113 $\mu\text{m s}^{-1}$) no ápice da motilidade (10–20 s) se aproxima dos valores registrados para vários teleósteos (80–357 $\mu\text{m s}^{-1}$) [18, 21, 48, 60, 61].

4.2.6 CONCLUSÕES

A diluição do sêmen em solução hiposmótica, eletrolítica ou não, ativa a motilidade do sêmen de *Megaleporinus obtusidens*, porém a composição da solução ativadora pode alterar o comportamento natatório dos espermatozoides. As soluções de NaCl e frutose com 145 mOsm kg⁻¹ prolongaram a taxa e o tempo de motilidade e produziram respostas semelhantes para a velocidade curvilínea e linearidade do deslocamento. A resposta dos espermatozoides ativados com KCl diferiu das demais soluções para a maioria das variáveis analisadas, e em concentrações superiores a 85 mOsm kg⁻¹ (32,5 mM) não foi adequada como solução ativadora por induzir os espermatozoides a um movimento circular.

4.2.7 REFERÊNCIAS

- [1] Zaniboni-Filho E, Schulz UH. Migratory Fishes of the Uruguai River. In: Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A, editors. Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status. Canada: IDRC and The World Bank; 2003. p. 156-94.
- [2] Reynalte-Tataje DA, Zaniboni-Filho E. Cultivo de piapara, piaçu, piava e piau - gênero *Leporinus*. In: Baldisserotto B, Gomes LdC, editors. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2nd ed. Santa Maria: UFSM; 2010. p. 73-99.
- [3] Glusczak L, Miron DS, Crestani M, Fonseca MB, Pedron FA, Duarte MF, et al. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). Ecotoxicol Environ Saf. 2006;65:237-41.
- [4] Fonseca MB, Glusczak L, Moraes BS, Menezes CC, Pretto A, Tierno MA, et al. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). Ecotoxicol Environ Saf. 2008;69:416-20.
- [5] Glusczak L, Loro VL, Pretto A, Moraes BS, Raabe A, Duarte MF, et al. Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). Arch Environ Contam Toxicol. 2011;61:624-30.
- [6] Gonzo G, Vera R, Martínez V, Romero M. Organización histológica del testículo y fecundidad de *Leporinus obtusidens* (Val. 1847), Peces Cypriniformes, Anostomatidae del río Juramento, Provincia de Salta Rev Asoc Cienc Nat Litoral. 1995;26:1-8.

- [7] Ciereszko A, Glogowski J, Dabrowski K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Tiersch TR, Green CC, editors. Cryopreservation in Aquatic Species. 2nd ed. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society; 2011. p. 46-79.
- [8] Verma DK, Routray P, Dash C, Dasgupta S, Jena JK. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. *Turk J Fish Aquat Sc.* 2009;9:67-76.
- [9] Cabrita E, Roblesand V, Herráez P. Sperm quality assessment. In: Cabrita E, Robles V, Herráez P, editors. *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Boca Ranton: CRC Press; 2008. p. 93-147.
- [10] Morisawa M. Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. *J Appl Ichthyol.* 2008;24:362-70.
- [11] Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes. II. Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International.* 2006;30:1-14.
- [12] Cosson J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquacult Int.* 2004;12:69-85.
- [13] Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International.* 2005;29:101-10.
- [14] Dzyuba V, Cosson J. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. *Reproductive Biology.* 2014;14:165-75.
- [15] Hu J, Zhang Y, Zhou R, Zhang Y. Changes in extracellular osmolality initiate sperm motility in freshwater teleost rosy barb *Puntius conchoniuis*. *Theriogenology.* 2009;72:704-10.
- [16] Krasznai Z, Márián T, Izumi H, Damjanovich S, Balkay L, Trón L, et al. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca^{2+} channels, leading to Ca^{2+} influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *P Natl Acad Sci USA.* 2000;97:2052-7.
- [17] Krasznai Z, Morisawa M, Morisawa S, Krasznai ZT, Trón L, Gáspár R, et al. Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. *Aquat Living Resour.* 2003;16:445-9.
- [18] Linhart O, Cosson J, Mims SD, Rodina M, Gela D, Shelton WL. Effects of ions on the motility of fresh and demembranate spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*) and paddlefish (*Polyodon spathula*). *Fish Physiol Biochem.* 2003;28:203-5.
- [19] Ögretmen F, Gökbaşı S, İnanan BE. Inhibitory effect of K^+ and Ca^{2+} concentrations, pH, and osmolality of activation solution on motility of shabut (*Barbus grypus* Heckel 1843) spermatozoa. *Turk J Fish Aquat Sc.* 2014;38:245-52.

- [20] Alavi SMH, Kozak P, Hatef A, Hamackova J, Linhart O. Relationships between reproductive characteristics in male *Vimba vimba* L. and the effects of osmolality on sperm motility. *Theriogenology*. 2010;74:317-25.
- [21] Alavi SMH, Rodina M, Policar T, Linhart O. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2009;153:430-7.
- [22] Kho KH, Masaaki M, Choi KS. Membrane hyperpolarization increases cAMP to induce the initiation of sperm motility in salmonid fishes, rainbow trout and masu salmon. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2003;13:833-40.
- [23] Takei GL, Mukai C, Okuno M. Regulation of salmonid fish sperm motility by osmotic shock-induced water influx across the plasma membrane. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2015;182:84-92.
- [24] Dziewulska K, Domagała J. Effect of pH and cation concentrations on spermatozoan motility of sea trout (*Salmo trutta* m. *trutta* L.). *Theriogenology*. 2013;79:48-58.
- [25] Dumorné K, Figueroa E, Cosson J, Lee-Estevez M, Ulloa-Rodríguez P, Valdebenito I, et al. Protein phosphorylation and ions effects on salmonid sperm motility activation. *Reviews in Aquaculture*. 2017;in press.
- [26] Alavi SMH, Cosson J, Karami M, Abdolhay H, Mojazi Amiri B. Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility. *Aquac Res*. 2004;35:1238-43.
- [27] Prokopchuk G, Dzyuba B, Rodina M, Cosson J. Control of sturgeon sperm motility: Antagonism between K^+ ions concentration and osmolality. *Animal Reproduction Science*. 2016;164:82-9.
- [28] Linhart O, Mims SD, Gomelsky B, Hiott AE, Shelton WL, Cosson J, et al. Ionic composition and osmolality of paddlefish (*Polyodon spathula*, Acipenseriformes) seminal fluid. *Aquacult Int*. 2003;11:357-68.
- [29] Orfão LH, Nascimento AF, Corrêa FM, Cosson J, Viveiros ATM. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture*. 2011;311:241-7.

- [30] Melo FCSA, Godinho HP. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. Anim Reprod. 2006;3:380-5.
- [31] Shimoda E, Andrade DR, Vidal Júnior MV, Yasui GS, Silva JFS, Godinho HP, et al. Efeitos da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. Ceres. 2007;54:430-3.
- [32] Gonçalves ACS, Nascimento AF, Costa AC, Leal MC, Viveiros ATM. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Anim Reprod. 2013;10:62-70.
- [33] Viveiros ATM, Leal MC, França TS, Almeida ILG, Isaú ZA. Osmolality and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen *Prochilodus lineatus* sperm differently. Animal Reproduction Science. 2016;173:73-9.
- [34] Carneiro PCF, Azevedo HC, Santos JP, Maria AN. Cryopreservation of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Semen: Extenders, Cryoprotectants, Dilution Ratios and Freezing Methods. Cryoletters. 2012;33:385-93.
- [35] Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. Theriogenology. 2007;67:661-72.
- [36] Rasband WS. ImageJ. Bethesda, Maryland, USA: U. S. National Institutes of Health; 1997-2016.
- [37] Kime DE, Van Look KJW, McAllister BG, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 2001;130:425-33.
- [38] CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. second ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; 1998.
- [39] Streit Jr DP, Moraes GV, Ribeiro RP, Povh JA, Souza ED, Oliveira CAL. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia. 2004;7:157-62.
- [40] Streit Jr DP, Sirol RN, Ribeiro RP, Moraes GV, Vargas LDM, Watanabe AL. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). Braz J Biol. 2008;68:373-7.
- [41] Blom E. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. Fertility and Sterility. 1950;1:176-7.
- [42] Kavamoto ET, Fogli da Silveira W. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*

(Valenciennes, 1840) em condições campo. Boletim do Instituto de Pesca. 1986;13:95-100.

[43] Zar JH. Biostatistical analysis. fifth ed. New Jersey: Prentice Hall; 2010.

[44] Howell DC. Statistical Methods for Psychology. Belmon, CA, USA: Wadsworth; 2012.

[45] Bozkurt Y, Ogretmen F, Secer FS, Ercin U. Effects of seminal plasma composition on sperm motility in mirror carp (*Cyprinus carpio*). The Israeli Journal of Aquaculture. 2009;61:307-14.

[46] Morita M, Takemura A, Okuno M. Requirement of Ca^{2+} on activation of sperm motility in euryhaline tilapia *Oreochromis mossambicus*. J Exp Biol. 2003;206:913-21.

[47] Billard R, Cosson J, Crim LW, Suquet M. Sperm physiology and quality. In: Bromage N, Roberts RJ, editors. Brood Stock Management and Egg and Larval Quality. Oxford, UK: Blackwell Science; 1995. p. 25-52.

[48] Alavi SMH, Rodina M, Viveiros ATM, Cosson J, Gela D, Boryshpolets S, et al. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). Theriogenology. 2009;72:32-43.

[49] Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner R. Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. J Fish Biol. 1995;47:492-508.

[50] Perchec G, Cosson MP, Cosson J, Jeulin C, Billard R. Morphological and kinetic changes of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water. Cell Motility and the Cytoskeleton. 1996;35:113-20.

[51] Adames MS, Toledo CPR, Neumann G, Buzzi AH, Buratto CN, Piana PA, et al. Optimization of the sperm:oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. Animal Reproduction Science. 2015;161:119-28.

[52] Ingermann RL, Schultz CLF, Kanuga MK, Wilson-Leedy JG. Metabolism of motile zebrafish sperm. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 2011;158:461-7.

[53] Ingermann RL. Energy metabolism and respiration in fish spermatozoa. In: Alavi SHM, Cosson J, Coward K, Rafiee G, editors. Fish spermatology. Oxford: Alpha Science International Ltd; 2008. p. 241-66.

- [54] Wilson-Leedy JG, Kanuga MK, Ingermann RL. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. *Theriogenology*. 2009;71:1054-62.
- [55] Inaba K. Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zool Sci*. 2003;20:1043-56.
- [56] Morita M, Okuno M, Susilo ES, Setyo BP, Martarini D, Harnadi L, et al. Changes in sperm motility in response to osmolality/ Ca^{2+} in three Indonesian fresh water teleosts: Goby (*Oxyeleotris marmorata*), Java carp (*Puntius javanicus*), and catfish (*Clarias batrachus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2006;143:361-7.
- [57] Kho KH, Tanimoto S, Inaba K, Oka Y, Morisawa M. Transmembrane cell signaling for the initiation of trout sperm motility: Roles of ion channels and membrane hyperpolarization for cyclic AMP synthesis. *Zool Sci*. 2001;18:919-28.
- [58] Dzyuba B, Bondarenko O, Fedorov P, Gazo I, Prokopchuk G, Cosson J. Energetics of fish spermatozoa: The proven and the possible. *Aquaculture*. 2017;472:60-72.
- [59] Hulak M, Rodina M, Linhart O. Characteristics of stripped and testicular Northern pike (*Esox lucius*) sperm: spermatozoa motility and velocity. *Aquat Living Resour*. 2008;21:207-12.
- [60] Alavi SMH, Rodina M, Policar T, Kozak P, Psenicka M, Linhart O. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenology*. 2007;68:276-83.
- [61] Linhart O, Alavi SMH, Rodina M, Gela D, Cosson J. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*). *J Appl Ichthyol*. 2008;24:386-92.

5 CONCLUSÕES GERAIS

- I. A gonadorelina é eficaz na indução hormonal de machos de *Megaleporinus obtusidens*.
- II. A dose mínima de $60 \mu\text{g kg}^{-1}$ aumenta significativamente o volume de sêmen produzido sem alterar a qualidade dos espermatozoides.
- III. É possível obter uma economia de 14% no custo de indução utilizando $60 \mu\text{g kg}^{-1}$ de gonadorelina.
- IV. A motilidade dos espermatozoides de *Megaleporinus obtusidens* é ativada por redução na osmolalidade do meio circundante.
- V. A osmolalidade e a composição da solução ativadora afetam a taxa de motilidade, a velocidade e a linearidade do movimento espermático.
- VI. Em osmolalidades intermediárias a taxa de motilidade manteve-se elevada e a duração do movimento foi prolongado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como sugestão de estudo para o futuro sugere-se validar o uso da gonadorelina em relação as taxas de fertilização, de eclosão e de deformidade larval. Como o sêmen produzido após a indução com gonadorelina não apresentou alteração de qualidade em relação aos controles, espera-se que não haja efeito significativo nessas variáveis.

Após várias tentativas, não foi possível avaliar o efeito das soluções ativadoras na fertilização artificial. Há estudos demonstrando que a taxa de fertilização pode aumentar na presença de eletrólitos ou frutose. Este seria o passo seguinte no sentido de aperfeiçoar a fertilização artificial de *Megaleporinus obtusidens*, considerando que as taxas de fertilização desta espécie frequentemente são insatisfatórias.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

AGOSTINHO, A. A. et al. Migratory Fishes of the Paraná River Basin, Brazil. In: J. Carolsfeld; B. Harvey; C. Ross; A. Baer (Eds.). **Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. Canada: IDRC and The World Bank, 2003. p.19-98.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, v. 29, n. 2, p. 101-110, 2005.

_____. Sperm motility in fishes. II. Effects of ions and osmolality: A review. **Cell Biology International**, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2006.

ALAVI, S. M. H. et al. Relationships between reproductive characteristics in male *Vimba vimba* L. and the effects of osmolality on sperm motility. **Theriogenology**, v. 74, n. 2, p. 317-325, 2010.

ALAVI, S. M. H. et al. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. **Aquat. Living Resour.**, v. 21, n. 1, p. 75-80, 2008.

ARAYA, P. R. Estudio preliminar de edad y crecimiento de la boga *Leporinus obtusidens* (Pisces, Anostomidae), en un tramo del río Alto Paraná, Argentina. **Revista de Ictiología**, v. 7, n. Especial, p. 59-65, 1999.

ARAYA, P. R.; AGOSTINHO, A. A.; BECHARA, J. A. The influence of dam construction on a population of *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1847) (Pisces, Anostomidae) in the Yacyreta Reservoir (Argentina). **Fisheries Research**, v. 74, n. 1-3, p. 198-209, 2005.

BARASSA, B. Estudo da susceptibilidade à infecção natural por parasitos myxozoa (Myxosporea: Myxobolidae) em dourado (*Salminus brasiliensis*) e piapara (*Leporinus obtusidens*) oriundos de ambiente natural. 2009. 59 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.

BERNARDES JÚNIOR, J. J. **Maturação da piava *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1847) (Actinopterygii, Anostomidae) em sistema indoor sob diferentes temperaturas da água.** 2012. 74p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

BILLARD, R. et al. Sperm physiology and quality. In: N. Bromage; R. J. Roberts (Eds.). **Brood Stock Management and Egg and Larval Quality.** Oxford, UK: Blackwell Science, 1995. p.25-52.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 535-548, 2010.

BORGES, A. et al. Biochemical Composition of Seminal Plasma and Annual Variations in Semen Characteristics of Jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 1, p. 45-53, 2005.

BOZKURT, Y. et al. Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasison sperm motility. **Czech Journal of Animal Science** v. 56, p. 355-364, 2011.

CARNEIRO, P. C. et al. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryo Letters**, v. 33, n. 5, p. 385-93, 2012.

CARRILLO, M.; ZANUY, S.; BAYARRI, M. J. El control ambiental de la reproducción de los peces con especial referencia al control del ciclo sexual, de la pubertad y de la precocidad. In: M. a. C. Estévez (Ed.). **La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura.** Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2009. p.173-246.

CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: T. R. Tiersch; C. C. Green (Eds.). **Cryopreservation in Aquatic Species: Advances in World Aquaculture.** 2nd. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, v.7, 2011. p.46-79.

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, v. 12, n. 1, p. 69-85, 2004.

COSTA, S. D.; HARTZ, S. M. Evaluation of trace metals (cadmium, chromium, copper and zinc) in tissues of a commercially important fish (*Leporinus obtusidens*) from Guaíba Lake, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 241-250, 2009.

DA FONSECA, M. B. et al. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piaua freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 3, p. 416-420, 2008.

DE MELLO, R. F. et al. Suplementação da dieta de alevinos de piaçu (*Leporinus obtusidens*) com vitamina C. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 1223-1231, 1999.

DIAS JÚNIOR, W.; MOURGUÉS-SCHURTER, L. R. Comportamento alimentar, determinação do horário de fornecimento e do tempo de disponibilidade da ração para *Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1847 (Osteichthyes, Characiformes, Anostomidae) (Piau). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 5, p. 1043-1050, 2001.

_____. Circadian changes in thyroid hormones of piaua, *Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1847 (Osteichthyes, Anostomidae) after feeding. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 31, n. 4, p. 439-446, 2009.

DZIEWULSKA, K.; DOMAGAŁA, J. Effect of pH and cation concentrations on spermatozoan motility of sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.). **Theriogenology**, v. 79, n. 1, p. 48-58, 2013.

DZYUBA, V.; COSSON, J. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. **Reproductive Biology**, v. 14, n. 3, p. 165-175, 2014.

FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 636-643, 2010.

FELIPETTO, J. E. D. S. et al. Substituição de fígado bovino por glúten de milho, glúten de trigo e farelo de soja em rações para pós-larvas de

piavas (*Megaleporinus obtusidens*). **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 192-197, 2005.

FELTRAN, R. D. B. et al. Prevalência, abundância, intensidade e amplitude de infecção de nematóides intestinais em *Leporinus friderici* (Bloch, 1794) e *L. obtusidens* (Valenciennes, 1836) (Pisces, Anostomidae), na represa de Nova Ponte (Perdizes, MG). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 6, n. 2, p. 169-179, 2004.

GIODA, C. R. et al. Exposure to sublethal concentrations of Zn(II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. **Chemosphere**, v. 69, n. 1, p. 170-175, 2007.

GLUSCZAK, L. et al. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 2, p. 237-241, 2006.

GOMES, L. C.; URBINATI, E. C. Matrinxã (*Brycon amazonicus*). In: B. Baldisserotto; L. D. C. Gomes (Eds.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2010. p.149-174.

GONÇALVES, A. C. S. et al. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Animal Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 62-70, 2013.

GONZO, G. et al. Organización histológica del testículo y fecundidad de *Leporinus obtusidens* (Val. 1847), pisces Cypriniformes, Anostomatidae del río Juramento, Provincia de Salta **Rev. Asoc. Cienc. Nat Litoral**, v. 26, n. 2, p. 1-8, 1995.

HARVEY, B. J.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa, Canadá: International Development Research Centre, 1993. 144 p.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2015**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. 49 p. ISBN 0101-4234.

IHERING, R. V. A method for inducing fish to spawn. **Progressive Fish-Culturist**, v. 34, p. 15-16, 1937.

INABA, K. Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. **Zoological Science**, v. 20, n. 9, p. 1043-1056, 2003.

KHO, K. H.; MASAAKI, M.; CHOI, K. S. Membrane hyperpolarization increases cAMP to induce the initiation of sperm motility in salmonid fishes, rainbow trout and masu salmon. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 833-840, 2003.

KHO, K. H. et al. Transmembrane cell signaling for the initiation of trout sperm motility: Roles of ion channels and membrane hyperpolarization for cyclic AMP synthesis. **Zoological Science**, v. 18, n. 7, p. 919-928, 2001.

KIME, D. E. et al. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 130, n. 4, p. 425-433, 2001.

KOLDRAS, M. et al. Study of the composition of seminal fluid and of sperm motility along the genital tract, during a spawning season, in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Living Resour.**, v. 9, n. 4, p. 337-345, 1996.

KRASZNAI, Z. et al. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca^{2+} channels, leading to Ca^{2+} influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 5, p. 2052-2057, 2000.

KRASZNAI, Z. et al. Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. **Aquatic Living Resources**, v. 16, n. 5, p. 445-449, 2003.

KRUGER, J. C. D. W. et al. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Journal of Fish Biology**, v. 24, n. 3, p. 263-272, 1984.

LAZZARI, R. et al. Composição corporal e crescimento de juvenis de piava alimentados com dietas contendo farinhas de trigo e milho submetidas ao cozimento. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1824-1827, 2007.

LINHART, O. et al. Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 19, n. 3, p. 177-181, 2003.

LINHART, O. et al. Effects of osmolality and ions on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater-and seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Fish Biology**, v. 55, n. 6, p. 1344-1358, 1999.

MAÑANÓS, E.; DUNCAN, N.; MYLONAS, C. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In: E. Cabrita; V. Robles; P. Herráez (Eds.). **Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species**. Boca Ranton: CRC Press, 2008. p.3-80.

MARIA, A. N. et al. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, v. 20, p. 39-43, 2012.

MIRON, D. D. et al. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 74, n. 1, p. 1-5, 2008.

MOJICA, C. A. P. **Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei)**. 2004. 82p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2004.

MORAES, B. S. et al. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 68, n. 8, p. 1597-1601, 2007.

MORAES, B. S. et al. Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, p. 57-62, 2009.

MORAES, G. V. et al. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozoides de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, n. 2, p. 109-116, 2004.

MORISAWA, M. Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 362-370, 2008.

MUNIZ, J. A. S. M.; CATANHO, M. T. J. D.; SANTOS, A. J. G. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 2, p. 205-211, 2008.

MUNRO, A. D. Tropical freshwater fish. In: A. D. Munro; A. P. Scott; T. J. Lam (Eds.). **Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences**. Florida: CRC Press, 1990. p.145-239.

MURGAS, L. D. S. et al. Avaliação quantitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 246-248, 1999.

MURGAS, L. D. S. et al. Viabilidade seminal de Piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen à 4 °C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 211-213, 2002.

ORFÃO, L. H. et al. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, v. 311, n. 1-4, p. 241-247, 2011.

PARDO-CARRASCO, S. C. et al. Evaluation of milt quality of the yamú *Brycon amazonicus* under hormonal induction. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 19, n. 2, p. 134-139, 2006.

PARMA DE CROUX, M. J. Crecimiento de *Leporinus obtusidens* (Val) (Pisces, Anostomidae) con diferentes raciones de alimento balanceado. **Memorias de la Asociacion Latinoamericana de Acuicultura**, v. 5, n. 3, p. 547-552, 1984.

_____. Metabolic rate of juvenile *Leporinus obtusidens* (Pisces, Anostomidae) in relation to body size and temperature. **Polskie Archiwum Hydrobiologii**, v. 40, n. 2, p. 209-215, 1993.

PARMA, M. J. Crecimiento de *Leporinus obtusidens* (Valenciennes) (Pisces, Anostomidae) bajo diferentes dietas artificiales. **Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral**, n. 11, p. 1-11, 1980.

PAULINO, M. S. et al. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de buserelina. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 1, p. 39-45, 2011.

PERCHEC, G. et al. Morphological and kinetic changes of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 35, n. 2, p. 113-120, 1996.

POUPARD, G. P. et al. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. **Aquaculture**, v. 160, n. 3-4, p. 317-328, 1998.

RADÜNZ NETO, J. et al. Alimentação da piava (*Leporinus obtusidens*) com diferentes fontes protéicas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1611-1616, 2006.

RAMÍREZ-MERLANO, J.; ROBLES, V. M. M.; CASALLAS, P. E. C. Variación estacional de las características seminales del bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Telostei, pimelodidae). **Rev MVZ Córdoba**, v. 16, n. 1, p. 2336-2348, 2011.

REYNALTE-TATAJE, D. A. et al. Reproducción inducida del piauçu, *Leporinus macrocephalus* Garavello y Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2002.

REYNALTE-TATAJE, D. A. et al. Locais de crescimento de larvas de peixes na região do Alto Rio Uruguai (Brasil). In: E. Zaniboni-Filho; A. P. D. O. Nuñez (Eds.). **Reservatório de Itá**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2008. p.159-193.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; ZANIBONI-FILHO, E. Cultivo de piapara, piaçu, piava e piau - gênero *Leporinus*. In: B. Baldisserotto; L. D. C. Gomes (Eds.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2nd. Santa Maria: UFSM, 2010. p.73-99.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 75-79, 2003.

RURANGWA, E. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, n. 1-4, p. 1-28, 2004.

SALBEGO, J. et al. Herbicide Formulation with Glyphosate Affects Growth, Acetylcholinesterase Activity, and Metabolic and Hematological Parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 3, p. 740-745, 2010.

SAMPAIO, E. V.; SATO, Y. Aspectos reprodutivos de *Leporinus piau* Fowler, 1941 (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio São Francisco, submetido à desova induzida. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 157-165, 2009.

SATO, Y. et al. Induced reproductive responses of the neotropical anostomid fish *Leporinus elongatus* Val. under captive breeding. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 2, p. 189-193, 2000.

SCHÜTZ, J. H.; NUÑER, A. P. D. O.; ZANIBONI-FILHO, E. Biotelemetria de peixes migradores no Alto Rio Uruguai. In: E. Zaniboni-Filho; A. P. D. O. Nuñer (Eds.). **Reservatório de Itá**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2008. p.48-86.

SHIMODA, E. et al. Efeitos da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. **Ceres**, v. 54, n. 315, p. 430-433, 2007.

SILVEIRA, F. S.; SILVA, F. M.; CASACA, J. M. **Desempenho Catarinense na Piscicultura de Água Doce**. Florianópolis: EPAGRI - CEDAP, 2014. 11 p.

STREIT JR, D. P. et al. Estudo comparativo da indução hormonal da espermiacção em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 25, n. 2, p. 261-266, 2003.

STREIT JR, D. P. et al. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 2, p. 373-377, 2008.

TAITSON, P. F.; CHAMI, E.; GODINHO, H. P. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 3-4, p. 283-291, 2008.

TELCHEVSKY DE FOLGUERA, S. Ciclo sexual y mecanismo de maduración del ovario de la boga, *Leporinus obtusidens* (Val.). **Ecología**, v. 6, n. 1, p. 9-14, 1981.

VERMA, D. K. et al. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 9, p. 67-76, 2009.

VIVEIROS, A.; GODINHO, H. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 137-150, 2009.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Osmolality and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen *Prochilodus lineatus* sperm differently. **Animal Reproduction Science**, v. 173, p. 73-79, 2016.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. Brasília, Brazil: FAO/CODEVASF/CNPq, 1983. 225 p.

ZANIBONI-FILHO, E. Utilização do LHRH-a para indução à espermiacção e desova do Pacu-caranha, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). **Biotemas**, v. 8, n. 1, p. 36-45, 1995.

ZANIBONI-FILHO, E.; BARBOSA, N. D. C. Priming hormone administration to induce spawning of some brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, n. 4, p. 655-659, 1996.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: J. E. P. Cyrino; E. C. Urbinati; D. M. Fracalossi; N. Castagnolli (Eds.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 4, p.45-73.

ZANIBONI-FILHO, E. et al. Alterações espaciais e temporais da estrutura da comunidade de peixes em decorrência da implantação do reservatório de Itá (Alto Rio Uruguai). In: E. Zaniboni-Filho; A. P. D. O. Nuñer (Eds.). **Reservatório de Itá**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2008. p.21-48.

ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Migratory Fishes of the Uruguai River. In: J. Carolsfeld; B. Harvey; C. Ross; A. Baer (Eds.). **Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. Canada: IDRC and The World Bank, 2003. p.156-194.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.

ZANUY, S. et al. Regulación y control hormonal del processo reproductor de los teleósteos. In: M. a. C. Estévez (Ed.). **La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Madri: Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2009. cap. 2, p.97-172.

APÊNDICE A – PARÂMETROS UTILIZADOS NO PLUGIN CASA

Parâmetros do plugin	Valor aplicado
Minimum sperm size (pixels)	4
Maximum sperm size (pixels)	25
Minimum track length (frames)	100
Maximum sperm velocity between frames (pixels)	8
Minimum VSL for motile ($\mu\text{m s}^{-1}$)	3
Minimum VAP for motile ($\mu\text{m s}^{-1}$)	10
Minimum VCL for motile ($\mu\text{m s}^{-1}$)	15
Low VAP speed ($\mu\text{m s}^{-1}$)	10
Maximum percentage of path with zero VAP	1
Maximum percentage of path with low VAP	15
Low VAP speed 2 ($\mu\text{m s}^{-1}$)	25
Low VCL speed ($\mu\text{m s}^{-1}$)	50
High WOB (percent VAP/VCL)	80
High LIN (percent VSL/VAP)	80
High WOB two (percent VAP/VCL)	50
High LIN two (percent VSL/VAP)	60
Frame rate (frames per second)	100
Microns per 1000 pixels	925,9259

ANEXO A – PROTOCOLO CEUA

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00788

Título

Desenvolvimento de Tecnologia de Cultivo de Peixes Nativos pelo LAPAD/UFSC.

Data de Entrada

14/08/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

04/10/2013

Considerações

Ofício nº 105/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Evoy Zaniboni Filho, Departamento de Aquicultura - CCA

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de dez mil peixes: Jundiá (*Rhamdia quelen*); Dourado (*Salminus brasiliensis*); Surubi (*Steindachneridion scriptum*); Piava (*Leporinus obtusidens*), Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*); Curimba (*Prochilodus lineatus*) e Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*).

- Procedência do animal: Bacia do rio Uruguai e produção própria.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 07/01/2017

Data 07/10/2013

Parecer(es):

**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**